

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Transformación del Suero de Queso por Procesos Fermentativos

426 (2)

TESIS

Carlos Fernando Mignone

1982

autos

18/XI/1982

7/1/98

51629

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6077/79 ext. 129



DEX-51629

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



**Transformación del Suero de
Queso por Procesos
Fermentativos**



T E S I S
Carlos Fernando Mignone
1982

Director de Tesis:

Prof. Dr. Luis A. Mazza

El presente trabajo de tesis
fue realizado en la Cátedra de
Procesos Bioquímicos Fundamentales
de la Facultad de Ciencias Exactas
de la Universidad Nacional de
La Plata.

Agradecimiento:

A los Dres. Antonio P. Balatti y Luis A. Mazza, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, el otorgarme sucesivas becas que hicieron posible la concreción de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata, por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

A los Ingenieros A.M. Gamero y A.D. Rocha de la Cátedra de Zootecnia de la Facultad de Agronomía de La Plata, por su colaboración en la realización de los ensayos de alimentación con aves.

Al Dr. J. Sanahuja y la Dra. María E. Sambucetti del Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Buenos Aires, por los ensayos de evaluación del valor biológico del producto obtenido por fermentación del suero de queso.

Al Sr. Jorge A. Argemí por su invalorable asistencia técnica, como así también al personal del CINDEFI.

INDICE

	Página
Introducción -----	1
Materiales y métodos -----	10
Microorganismo -----	17
I. Obtención y evolución de un preparado proteico no convencional a partir de suero de queso ----	20
1.1. Estudio de medio y condiciones de operación para el cultivo de K. fragilis -----	23
1.2. Producción de un preparado proteico en escala industrial, análisis y ensayo en animales ----	31
II. Aspectos vinculados a la obtención de proteínas no convencionales.	
II.1. Estimación del rendimiento celular en cultivos que contienen sólidos en suspensión -----	50
II.2. Cultivo discontinuo alimentado: Modelo mate- mático -----	65
Experiencias de cultivos discontinuos alimen- tados -----	78
II.3. Influencia de la presencia de mutantes respira- torias en el inóculo sobre el rendimiento en biomasa de K. fragilis -----	100
Conclusiones generales -----	117
Bibliografía -----	119

INTRODUCCION

La obtención de alimentos ha sido siempre motivo de gran preocupación para los pueblos y, en la antigüedad, causa de más de una guerra. La población mundial en el año 1967 era de 3.500 millones, en la actualidad es de 4.500 millones y se estima que para el año 2.000 seá de aproximadamente 7.000 millones; es decir que, tomando como referencia el año 1967, en 33 años la población mundial se habrá duplicado, lo cual da una tasa anual de crecimiento de 2,1%; sin embargo se cree que dicha velocidad, la mayor en la historia de la humanidad, continuará aumentando hasta alcanzar valores de 2,5%/año antes de comenzar a declinar⁽³⁷⁾.

Resulta obvio que tal tasa de crecimiento poblacional debe ser acompañada por otra equivalente en la cantidad de alimentos.

Según la FAO, durante las dos últimas décadas la producción de alimentos tanto a nivel mundial como regional fue mayor que el aumento de la población, pero la diferencia entre ambas se ha estrechado⁽¹⁾. Esto indica que la tasa de producción anual de alimentos es inferior que la de crecimiento poblacional, con lo cual al correr del tiempo, de no revertirse esta tendencia, se producirá una verdadera deficiencia alimentaria.

Por otra parte, dentro de la alimentación, es bien conocido el papel que juegan las proteínas, como así también la importancia que reviste la calidad (valor biológico) de las mismas. Esto se refleja en un informe del Comité Asesor de las Naciones Unidas sobre la aplicación de la Ciencia y Tecnología referente a la producción y consumo de proteínas comestibles donde se destaca la importancia y gravedad que reviste el problema de la alimentación proteica en el ser humano. Existen millones de niños que por falta de calorías y proteínas sufren retraso físico y mental⁽²⁾.

El problema está planteado: deficiencia alimentaria con el agravante de la deficiencia en proteínas. ¿Qué soluciones puede aportar el hombre a este problema?. Una posible solución, si bien difícil de llevar a cabo por razones culturales y/o éticas, consiste en controlar el aumento de la población.

Otra, es aumentar la cantidad de alimentos y dentro de éstos la de proteínas.

Esto último es aún factible, incrementando el rendimiento de las cosechas, sea por el uso de fertilizantes, por el de variedades genéticamente mejoradas tal que se adapten a climas donde normalmente no hubiesen crecido, o con un contenido mayor de proteínas. Se han encontrado variedades de trigo que resultan más eficientes que otras en convertir el nitrógeno del suelo en proteínas, lo cual sugeriría la posibilidad de introducir genes específicos que podrían causar un incremento del 2 al 5% en el contenido de proteína del grano de trigo⁽³⁸⁾.

De especial interés resulta la transformación de compuestos nitrogenados no proteicos obtenidos por síntesis química (ej. urea) en proteína de alto valor biológico. Por ejemplo, se ha demostrado que es posible obtener buenos rendimientos en leche vacuna mediante dietas que contienen urea o sales de amonio como única fuente de nitrógeno⁽³⁸⁾.

Otra posibilidad que permitiría incrementar la cantidad de alimentos sería la incorporación a las tierras productivas de las denominadas áreas marginales, es decir zonas que, si bien potencialmente productivas, por algún motivo (ej.: régimen de lluvias insuficiente) no son utilizadas actualmente para producción.

Específicamente dentro del tema de las proteínas, existen además de las fuentes tradicionales (carnes, derivados lácteos, vegetales) otras no tradicionales destinadas a ocupar un lugar preponderante dentro de la alimentación mundial. Las fuentes tradicionales dependen en última instancia de las tierras aptas para producción las cuales, inexorablemente, tendrán un tope, y es aquí donde intervienen las no tradicionales, por no tener una sujeción tan estricta a las tierras. Una parte de estas fuentes no tradicionales la constituyen subproductos de la industria alimentaria. Por ejemplo los concentrados de pescado, o la torta que queda luego de extraer el aceite de semilla de oleaginosas (50% de proteínas) pueden ser incorporados a la dieta humana, sea directamente, mejorando previamente su palatabilidad, o indirectamente utilizándolos como fuente de nitrógeno en balanceados destinados

a la alimentación animal. Sin embargo en los últimos años los investigadores han centrado su atención en otra fuente no tradicional de proteínas: los microorganismos. Estos contienen, término medio, entre 40 y 50 % de proteínas y presentan además las siguientes ventajas:

- 1.- Pueden crecer sobre sustratos muy variados.
- 2.- Su obtención es independiente de las condiciones climáticas.
- 3.- Las instalaciones necesarias para su producción requieren poco espacio.
- 4.- Corto tiempo de duplicación.

Este último punto es importante porque supone una gran ventaja con respecto a las fuentes tradicionales tal como se desprende del cuadro I⁽³⁹⁾.

Cuadro I

Valores comparativos del tiempo de duplicación de la biomasa para diferentes organismos.

Organismo	Tiempo de duplicación (mínimo) de la biomasa
Bacterias - Levaduras	20 - 120 minutos
Hongos - Algas	2 - 6 horas
Pasturas y algunas plantas	1 - 2 semanas
Pollos	2 - 4 semanas
Cerdos	4 - 6 semanas
Ganado vacuno	1 - 2 meses

Cuando se considera la cantidad de proteína producida por día a partir de fuentes tradicionales y microorganismos⁽³⁾ (Cuadro II), la ventaja a favor de estos es más que evidente.

Cuadro II

Rendimiento proteico en fuentes tradicionales y en microorganismos

	Proteína producida por c/1000 Kg. (Kg/día)	Rendimiento diario %
Ganado vacuno	1	0,1
Soja	10	1
Levaduras	10 ⁶	10 ⁵
Bacterias	10 ¹¹	10 ¹⁰

Todo esto hace que el costo de producción de microorganismos con fines alimentarios sea menor que el de muchas fuentes tradicionales de proteínas. En el cuadro III se da el precio relativo de algunos productos tradicionales, en pesos/Kg. de proteína con respecto a las proteínas de origen microbiano a las que arbitrariamente se les ha asignado el valor de 1 peso/Kg. de proteína⁽⁴⁰⁾.

Cuadro III

Costos relativos para proteínas de distintos orígenes

	\$/Kg. de proteína
Harina de soja	1
Proteínas microbianas	1
Pollos	5
Queso	8,4
Cerdos	8,7
Huevos	9,1
Corderos	13,7
Vacunos	13,7

Obviamente estos valores están sujetos a variaciones, según el país de que se trate, pero de todos modos la tendencia es muy clara. Por otra parte, la posibilidad de crecer sobre sustratos muy distintos permite resolver, al menos en parte, otro serio problema que enfrenta la humanidad, la contaminación ambiental. En efecto, muchos efluentes industriales (sólidos y líquidos) poseen una composición química capaz de soportar, convenientemente suplementados, el crecimiento de microorganismos. Como ejemplos pueden citarse algunos procesos que actualmente se cumplen a nivel industrial: Producción de *Torula utilis* sobre melazas de caña y remolacha, suero de queso, derivados del petróleo, líquido sulfítico⁽⁴⁾, producción de *Saccharomyces fragilis* (actualmente *Kluiveromyces*⁽⁵⁾⁽⁶⁾) sobre suero de queso⁽⁷⁾, etc.. A esta nueva fuente de proteínas se la conoce como Proteínas Unicelulares (P.U.)⁽⁸⁾. Dicho término engloba a todo microorganismo (bacterias, algas, hongos y levaduras) susceptible de ser cultivado

con fines alimentarios, sean para humanos o animales.

La selección de un microorganismo en particular dependerá de aspectos nutricionales -calidad y contenido en proteínas-, tecnológicos, económicos, disponibilidad del sustrato, costo del mismo, rendimiento celular por unidad del sustrato, productividad, etc., y finalmente las características que se desean en el producto final: textura, aroma, sabor, etc. (8).

Los pasos a seguir para la producción de P.U. son más o menos los mismos, independientemente del microorganismo utilizado y comprenden:

- 1.- Disponer de una fuente de carbono asimilable y económica (preferentemente algún subproducto). Para lograr esta condición en algunos casos debe someterse dicha fuente a tratamientos preliminares, por ej. hidrólisis si se trata de un polisacárido.
- 2.- Preparación de un medio de cultivo balanceado suplementando a la fuente de carbono con compuestos nitrogenados, fósforo, sales y factores de crecimiento. Si el microorganismo a utilizar es un alga unicelular la fuente de carbono será CO_2 , el cual se hace burbujear en el medio de cultivo o se lo suministra por algún otro artificio.
- 3.- Etapa de desarrollo del microorganismo en el medio de cultivo, donde el sustrato carbonado es transformado en biomasa, la cual contendrá aproximadamente un 50% de proteínas.
- 4.- Separación de la biomasa del medio de cultivo agotado.
- 5.- Tratamiento del material celular para obtener el producto terminado incluyendo o no operaciones de purificación.

Con respecto a la tercer etapa, que involucra el cultivo del microorganismo propiamente dicho, existen básicamente tres modos de llevarla a cabo:

1. Cultivo discontinuo (Batch): El volumen total del medio de cultivo es sembrado con el microorganismo y éste desarrolla siguiendo una cinética sigmoidea en el tiempo. Concluída la misma las células son cosechadas.
2. Cultivo continuo: El medio de cultivo ingresa a un caudal determinado al reactor en el cual se lleva a cabo el cultivo. Dicho reactor está provisto de un rebalse, por el cual sale el medio de cultivo parcialmente agotado junto con las células formadas, por lo que el volumen de cultivo se mantiene constante.

El sistema formado es tal que, bajo ciertas condiciones, alcanza un estado estacionario tanto en la concentración de biomasa como en la de los nutrientes del medio de cultivo.

3. Cultivo discontinuo alimentado (Fed-batch): Este caso es intermedio entre los dos anteriores. El reactor en el cual se lleva a cabo el desarrollo es alimentado con medio de cultivo pero en este caso no existe ningún rebalse, por lo que el volumen aumenta con el tiempo. La concentración de biomasa variará en el tiempo o no, según cómo se diseñe la alimentación. Se puede dar el caso en que la cantidad de biomasa aumente a la misma velocidad a la que lo hace el volumen del cultivo, por lo que en el tiempo la concentración permanecerá constante. Es un estado quasi estacionario⁽⁴¹⁾.

Dentro de este contexto, merece especial atención la calidad de la proteína, la cual puede ser evaluada mediante distintos parámetros como: digestibilidad, valor biológico, relación de eficiencia proteica, etc..

Las proteínas bacterianas son más ricas en aminoácidos que contienen azufre que las levaduras, y esto hace que tengan un mayor valor biológico (V.B.). Sin embargo es posible subsanar este inconveniente suplementando la proteína de levaduras con aminoácidos azufrados^(10,11,79).

Otro factor que debe ser considerado con respecto al V.B. de las proteínas unicelulares, es la pared de los microorganismos. Estudios sobre ratas mostraron que la ruptura de la célula trajo como consecuencia un incremento del V.B.⁽¹²⁾.

Las proteínas unicelulares pueden ser destinadas a la alimentación animal o humana. En este último caso se debe tener en cuenta que estas proteínas tienen un contenido relativamente alto de ácidos nucleicos. En efecto, es bien conocido que el metabolismo de las purinas conduce a la formación de ácido úrico y que esto es causante de gota (formación de cristales de urea en las articulaciones) o bien se pueden formar cálculos en el tracto urinario cuando la solubilidad del ácido úrico, en orina, es sobrepasada.

Pruebas con humanos mostraron que, como máximo, se pueden ingerir 2 g de ARN de levadura por día (aproximadamente 45 g de levadura)⁽¹³⁾. Es por este motivo que se han estudiado

métodos para reducir el contenido de ácidos nucleicos, sobre todo en levaduras, por ser éstas las más ampliamente utilizadas para producir Proteínas Unicelulares. Entre los métodos utilizados merecen citarse el golpe térmico aplicado a células de *Candida utilis*, cuyo tenor en ácidos nucleicos es de aproximadamente 7%, obteniéndose luego del tratamiento preparados con no más de 1-1,5% de ácido nucleico y 50% de proteína⁽¹⁴⁾. Otro método propuesto se basa en la solubilización de proteínas de la levadura por tratamiento con NaOH (0,4%) y posterior precipitación del extracto alcalino a pH 4,3. De este modo el preparado contiene 83% de las proteínas y menos del 5% de los ácidos nucleicos originalmente presentes⁽¹⁵⁾. Finalmente se ha estudiado la reducción de ácidos nucleicos "in vivo" mediante el control de la relación C/P y el tipo de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo como así también la fase de crecimiento en que se cosechan las células. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da un mayor contenido en ácidos nucleicos que la urea⁽¹⁶⁾.

Este último método de reducción de ácidos nucleicos, aunque quizás no tan efectivo, tendría la ventaja sobre los otros que no importaría un mayor incremento en el costo de producción.

Es debido al problema del contenido en ácidos nucleicos que, hasta el presente, las proteínas unicelulares se han utilizado principalmente como fuente de proteína para animales que intervienen, por supuesto, en la cadena alimentaria del hombre, por ej. porcinos y gallináceos.

En resumen podemos considerar que si bien estas proteínas constituyen una fuente por demás interesante, ellas solas no podrán dar solución al problema de falta de alimentos. Dicha solución debe surgir a través de una mayor producción de las fuentes tradicionales mediante la aplicación de los conocimientos científicos y agrotecnológicos actualmente disponibles y al concurso de fuentes no tradicionales, como las proteínas unicelulares, que por su valor alimenticio, aceptabilidad y costo puedan incorporarse directa o indirectamente a la alimentación humana.

Habiendo destacado la importancia de las proteínas unicelulares como alimento para humanos, ya sea en forma

directa o a través de diferentes especies animales, resulta interesante considerar la obtención de proteínas a partir de sustratos de bajo costo, como es el suero de queso que constituye un subproducto de la industria láctea. En nuestro país la producción diaria oscila alrededor de 3.000 toneladas, de las cuales una pequeña parte se seca como tal, otra se usa como alimentos para cerdos y un gran volumen se dispone sin ningún tratamiento previo.

El alto contenido de lactosa que posee el suero, posibilita su transformación mediante microorganismos, ya sea para la obtención de biomasa o metabolitos de interés comercial. En la primera parte de este trabajo se presentan los estudios realizados para la transformación de suero de queso empleando una levadura del género *Kluiveromyces*, estableciendo las condiciones operativas y de medio de cultivo para la obtención de un preparado proteico, como así también la evaluación de las posibilidades de dicho preparado como alimento para animales.

En la segunda parte del trabajo se estudian diversos aspectos íntimamente relacionados a la obtención de proteínas no convencionales. Así, en lo referente a control de proceso, se propone un método que permite, bajo ciertas condiciones, evaluar el rendimiento celular (Y), cuyo valor da una medida de la eficiencia de conversión del sustrato hidrocarbonado en masa celular. Por otra parte se estudia la obtención de biomasa mediante un sistema de cultivo intermedio entre el cultivo discontinuo (batch) y el continuo; es decir un cultivo discontinuo alimentado (C.D.A.). Este sistema resulta interesante porque opera en forma relativamente simple y según algunos autores conduce a mayores rendimientos que el batch clásico⁽³³⁾. Previo a las experiencias se desarrolló un modelo matemático, el cual se expone detalladamente, con el objeto de obtener criterios que permitan diseñar un CDA. Es por este motivo que las experiencias realizadas estuvieron dirigidas hacia la verificación experimental del modelo, el cual es de carácter más general y puede constituir una contribución interesante al desarrollo de la tecnología de los procesos fermentativos.

Finalmente y en relación al proceso de obtención de proteínas unicelulares mediante levaduras, se realizaron estudios a fin de establecer la influencia de mutantes respiratorias sobre el rendimiento en biomasa. Dichas mutantes, normalmente presentes en las poblaciones de levaduras, presentan alteraciones en su capacidad para utilizar oxígeno, razón por la cual no pueden aprovechar eficientemente la fuente hidrocarbonada dando metabolitos (ej. etanol), que liberan al medio, con la consiguiente merma del rendimiento en biomasa.

MATERIALES Y METODOS

1. Medidas de la concentración celular:

- a. Técnicas Turbidimétricas: La densidad óptica de las suspensiones celulares fue determinada utilizando un espectrofotómetro "Espectronic 20", a 625 nm.
- b. Recuento de microorganismos totales: se efectuó utilizando una cámara de Neubauer doble siguiendo la técnica convencional para contar glóbulos rojos.
- c. Peso seco: muestras de 10 ml. se centrifugaron en una centrífuga ROLCO a 3.500 rpm. El residuo se lavó 2 veces con H₂O destilada en tubos previamente tarados, los cuales fueron llevados a estufa (a 105°C hasta pesada constante).
- d. Correlación entre peso seco y recuento celular:
Se realizó un cultivo en tanque utilizando el medio G, conteniendo suero desproteinizado en lugar de suero entero y una concentración de lactosa del orden de 6 g/l. Sobre una muestra del cultivo, en fase estacionaria, se determinó paralelamente el recuento celular en cámara de Neubauer y el peso seco, surgiendo la siguiente correlación:
$$\text{Peso seco (g/l)} = 1,22 \cdot 10^{-8} \times (\text{Recuento celular } \frac{\text{cel}}{\text{ml}}).$$

2. Lactosa y sacarosa: se determinaron en base al método de 0-Toluidina propuesto por Hulman y modificado por Hyvarinen y Nikkila⁽⁵⁸⁾.

3. Urea: Se determinó utilizando el método enzimático recomendado por Wiener⁽⁵⁹⁾.

4. Amoníaco: Para la determinación de amoníaco, se utilizó el mismo método que para Urea con la salvedad de que al tubo de reacción no se le adicionó Ureasa.

5. Lípidos: La materia grasa fue determinada por extracción en Soxhlet utilizando como solvente Cl₃CH.

6. Nitrógeno: Se determinó por el método de Kjeldahl según la Association Official Analytical Chemists⁽³⁴⁾.

7. Proteínas: El contenido de proteínas fue evaluado mediante la técnica propuesta por Stickland, H.L.⁽³⁵⁾.

8. Aminoácidos: La composición aminoacídica del preparado proteico se analizó según Vary and Johnson⁽⁶⁰⁾ previa hidrólisis de la muestra con HCl 6N a 110°C durante 24 horas en tubo cerrado a la llama.
9. Minerales: los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} se determinaron por quelatometría con EDTA⁽⁶¹⁾; el Na^+ por espectrometría de absorción atómica en muestra libre de materia orgánica⁽⁶²⁾. Para la determinación de fósforo se utilizó el método alcalimétrico y los óxidos (R_2O_3) se evaluaron por precipitación con NaOH y calcinación en crisol de Pt⁽⁶³⁾.
10. Determinación de lisina disponible: se efectuó por el método de S. Rhagavendar Rao y Col.⁽⁶⁴⁾.
11. Acido ribonucleico: para la determinación del RNA se utilizó el método indicado por Trevelyan y Harrison⁽⁶⁵⁾.
12. Valor biológico: se determinó a partir del valor de utilización proteica neta (UPN) y digestibilidad (D) según Miller y Bender⁽⁹⁾.
13. Determinaciones Manométricas:
La velocidad específica de consumo de O_2 (q_{O_2}) y la de producción de CO_2 (q_{CO_2}) se determinaron en un respirómetro Warburg convencional mediante el método directo⁽⁶⁶⁾.
14. Consumo de O_2 y producción de CO_2 durante el cultivo:
Se calculó en base a las siguientes expresiones⁽⁶⁷⁾:

$$V_{\text{CO}} = \frac{F_{\text{N}_2}}{V} \left(\frac{p_{\text{O}_1}}{p - p_{\text{O}_1} - p_{\text{C}_1}} - \frac{p_{\text{O}_2}}{p - p_{\text{O}_2} - p_{\text{C}_2}} \right)$$

$$V_{\text{PC}} = \frac{F_{\text{N}_2}}{V} \left(\frac{p_{\text{C}_2}}{p - p_{\text{C}_2} - p_{\text{O}_2}} - \frac{p_{\text{C}_1}}{p - p_{\text{C}_1} - p_{\text{O}_1}} \right)$$

V_{CO} : Velocidad de consumo de O_2 ($\frac{l}{l \cdot h}$)

V_{PC} : Velocidad de producción de CO_2 ($\frac{l}{l \cdot h}$)

F_{N_2} : Caudal de gas inerte (N_2) ($\frac{l}{h}$)

V: Volumen de cultivo (l)

P: Presión total

p_{O_1} : Presión parcial de O_2 en el gas que ingresa al fermentador.

p_{C_1} : Presión parcial de CO_2 en el gas que ingresa al fermentador

p_{O_2} : Presión parcial de O_2 en el gas que sale del fermentador

p_{c2} : Presión parcial de CO_2 en el gas que sale del fermentador.

No se incluye en las expresiones de V_{CO} y V_{PO} la presión de vapor de H_2O porque los gases de salida del fermentador, antes de analizarlos, se hicieron pasar por sílica gel con el objeto de secarlos y evitar interferencia en la determinación de CO_2 .

La presión parcial de O_2 se midió con un analizador de O_2 paramagnético Beckman, mientras que la de CO_2 con un analizador Hilger SB/ K_2 . En este último caso el H_2O interfiere porque la medida se basa en la absorción de radiación infrarroja. Ambos analizadores son continuos y el caudal que se hizo pasar por ellos estuvo dentro de los límites indicados por los fabricantes.

Tanto la cantidad total de O_2 consumido como la de CO_2 producido durante el cultivo, fue evaluada calculando el área bajo las respectivas curvas de V_{CO} y V_{PC} en $f(\theta)$; todos los valores están referidos a condiciones normales de presión y temperatura.

Cuando el cociente respiratorio de las células durante el cultivo, se mantuvo cercano a la unidad, se utilizaron las siguientes expresiones:

$$V_{CO} = \frac{F}{V} \left(\frac{p_{O1} - p_{O2}}{P} \right)$$

$$V_{PC} = \frac{F}{V} \left(\frac{p_{C2} - p_{C1}}{P} \right)$$

F : Caudal de aire (l/h)

15. El coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 , $K_L a$ fue determinado por el método de Cooper y Miller⁽⁸⁰⁾.
16. Desproteínización del suero de queso: se realizó según Wasserman y col.⁽¹⁹⁾.
17. Determinación de etanol: se realizó por el método de Nicloux⁽⁶⁸⁾ modificado según se indica a continuación; aproximadamente 40 ml de muestra se centrifugan, se lleva el sobrenadante a pH = 7-8 y se le adicionan 35 ml de H_2O . Esta solución se destila hasta recoger 40 ml. de destilado, el cual es

recibido sobre 5 ml. de H_2SO_4 3N. Sobre 5 ml. de esta solución se determina etanol por titulación con $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ al 1,9 % previa adición de 5-6 ml. de SO_4H_2 concentrado.

En el método original de Nicloux, el punto final está dado por el viraje de verde azulado a verde amarillo que indica un ligero exceso de Cr_2O_7 ; por lo tanto el punto final no es claro y está sujeto a errores. La modificación al método consiste en agregar un exceso conocido de Cr_2O_7 y titular por retorno con $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0,100 N (en SO_4H_2 4N) utilizando O-Fenantrolina como indicador. En estas condiciones en el punto final se produce un nítido viraje del verde al marrón. Finalmente el método se practicó del siguiente modo:

A 5 ml de muestra se le adicionan 2 ml. de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ al 1,9 % (p/v) seguidos de 5 o 6 ml. de SO_4H_2 concentrado, dejar reposar 5 min., la temperatura llega a 80-90°C, enfriar bajo canilla, agregar 2 gotas de O-Fenantrolina y titular con $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0,100 N hasta aparición de color marrón.

Se realiza un blanco con 5 ml. de H_2O

En estas condiciones resulta:

$$\text{Etanol (mg/ml)} = 0,23 (V_b - V_M)$$

V_b = ml de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ gastados en el blanco

V_M = ml de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ gastados con la muestra.

- El método se probó con soluciones testigo de etanol y los resultados se pueden apreciar en el Cuadro IV. Las muestras que están fuera del rango del método deben ser convenientemente diluídas.

Cuadro. IV

Valoración de etanol por el método de Nicloux modificado

Solución Testigo	TIT*	V_M (ml)	$(V_b - \bar{V}_M)$	Etanol
Etanol (mg/ml.)				
0,20	1a	6,96	0,87	0,20
	2a	6,84		
	3a	6,90		
0,60	1a	5,18	2,59	0,59
	2a	5,18		
	3a	5,16		
1,00	1a	3,42	4,34	0,99
	2a	3,44		
	3a	3,42		
1,50	1a	1,10	6,67	1,53
	2a	1,10		
	3a	1,10		

TIT* = Titulación

 \bar{V}_M = Valor promedio de las tres determinaciones V_b = 7,77 ml. (Cuadruplicado)

Se debe destacar que el método en sí no es nuevo ya que Smith, H. (1951) utiliza el mismo sistema pero con condiciones de reacción distintas por ej. la reacción se lleva a cabo a 60 °C. y utiliza SO_4H_2 13 N; y cada determinación ⁽⁶⁹⁾ requiere mas de una hora.

18.- Recuperación de etanol en los gases de salida del fermentador.

Se llevo a cabo haciendo pasar los gases por un refrigerante y posteriormente por un frasco lavador conteniendo SO_4H_2 3N.

19.- Inducción de mutantes respiratorias:

Para tal fin se siguió la técnica propuesta por Nagai, S ⁽⁷⁰⁾

20.- Detección y selección de mutantes respiratorias

a) Medio diferencial.

El medio contiene (g/l): glucosa 20; peptona 1,5; Extracto de levadura 1,5; PO_4H_2K 1,5; $SO_4(NH_4)_2$ 1,5; $SO_4Mg.7H_2O$ 2,0; Eosina 15 mg./l; Azul tripan 15 mg/l; Agar 15,0.

En este medio las células normales (respiración suficiente) dan colonias de color violeta mientras que las mutantes respiratorias (respiración deficiente) dan colonias rojas.

Para poner a punto esta técnica, ⁽⁵⁴⁾ se ensayaron distintas combinaciones de Eosina y Azul Tripan, encontrándose que la relación 15 - 15 (mg/l) respectivamente era la que mejor contraste daba entre ambos tipos de colonias.

b) Medio selectivo:

Este medio permite el crecimiento de células normales e impide el de mutantes respiratorias totales ($qo_2 = 0$), lo cual posibilita, utilizándolo junto a un control, cuantificar una población dada con respecto a cada tipo de célula realizando plaques en caja de Petri.⁽⁵¹⁾

El medio contiene (g/l): Lactato de Na 10,0; peptona 3,5; Extracto de levadura 3,0; PO_4H_2K 2,0; $SO_4Mg.7H_2O$ 10,0; $SO_4(NH_4)_2$ 1,0; Agar 15,0.

21.- Medio de cultivo

Medio base. (g/l): Lactosa 20,0; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,5; PO_4HK_2 2,5; Ácido cítrico monohidratado 1,09; pH = 5,7-5,5.

Medio A (g/l): Lactosa 6,0; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,2; PO_4HK_2 1,25; Ácido cítrico monohidratado 0,55; Extracto de levadura 2,0; Triptosa 1,5; pH 5,7 - 5,5.

Medio B (g/l): Lactosa 12,0; Urea 1,2; PO_4H_2K 9,65; ácido cítrico monohidratado 4,25; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,9; Extracto de levadura 2,6; pH 5,7 - 5,5 (La urea se esteriliza por separado a pH 4).

Medio C (g/l): Lactosa 15,5; $SO_4(NH_4)_2$ 2,4; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,4; PO_4HK_2 2,5; ácido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura 2,0; pH 5,7 - 5,5.

Medio F (g/l): Sacarosa 10,0; peptona 2,0; extracto de levadura 2,0; ClNa 0,1; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,2; PO_4H_2K 0,75; PO_4HK_2 0,60; $Cl_3Fe.6H_2O$ (10% p/v) 0,1 ml/l; $SO_4Mn.4H_2O$ (10% p/v) 0,1 ml/l

Medio G (g/l): $SO_4(NH_4)_2$ 5,0; PO_4H_2K 5,0; Extracto de levadura 1,0; Suero de queso C.S.P. alcanzar un tenor de lactosa de 20 g/l. pH = 5,7 - 5,5.

Medio H (g/l): Urea* 3,0; PO_4HK_2 1,5; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,15; Macerado de Maíz (sólido) 2,0; Suero de queso CSP 1000 ml. pH 5,5 - 5,7.

* Se esteriliza por separado a pH = 4

En todos los casos (salvo los medios G y H la fuente de carbono y el $SO_4Mg.7H_2O$ fueron esterilizados separadamente

del resto del medio de cultivo.

22.- Esterilización: Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

23.- Mantenimiento de la cepa: La cepa fue mantenida bajo vaselina en un medio sólido de composición (g/l); lactosa 5,0; PO_4HK_2 2,5; Acido cítrico Monohidratado 1,09; Urea 0,5; Extracto de levadura 1,0; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0; Agar 15,0; pH 5,7 - 5,5. Este medio sin vaselina, fue utilizado para repicar la cepa en tubo inclinado. (Medio D).

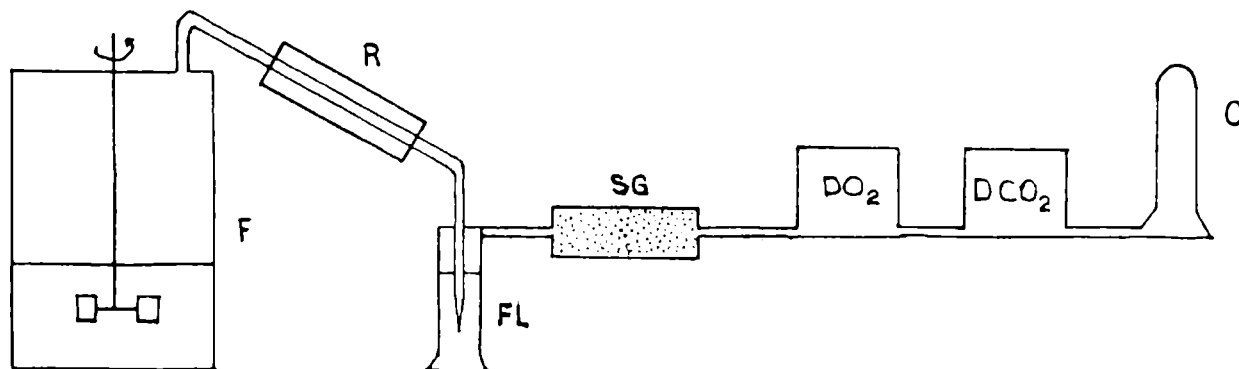
24.- Inóculos.

Para la preparación de inóculos para cultivos en tanque agitado y estudios de procesos en escala de frascos agitados se utilizaron erlenmeyers de 1000 ml. con 100 ml. de medio (salvo que se indique otra cosa) a 30°C en un agitador rotatorio a 250 r.p.m. con 2,5 cm. de excentricidad. Los mismos fueron sembrados a partir de una suspensión celular en H_2O estéril proveniente del desarrollo en un tubo inclinado en el medio D.

25.- Cultivos en tanques agitados:

Los cultivos se realizaron en fermentadores New Brunswick de 7,5 litros con un volumen de cultivo que se indica en cada caso, a 30°C . Las condiciones de operación (agitación, aeración) se indican en cada experiencia.

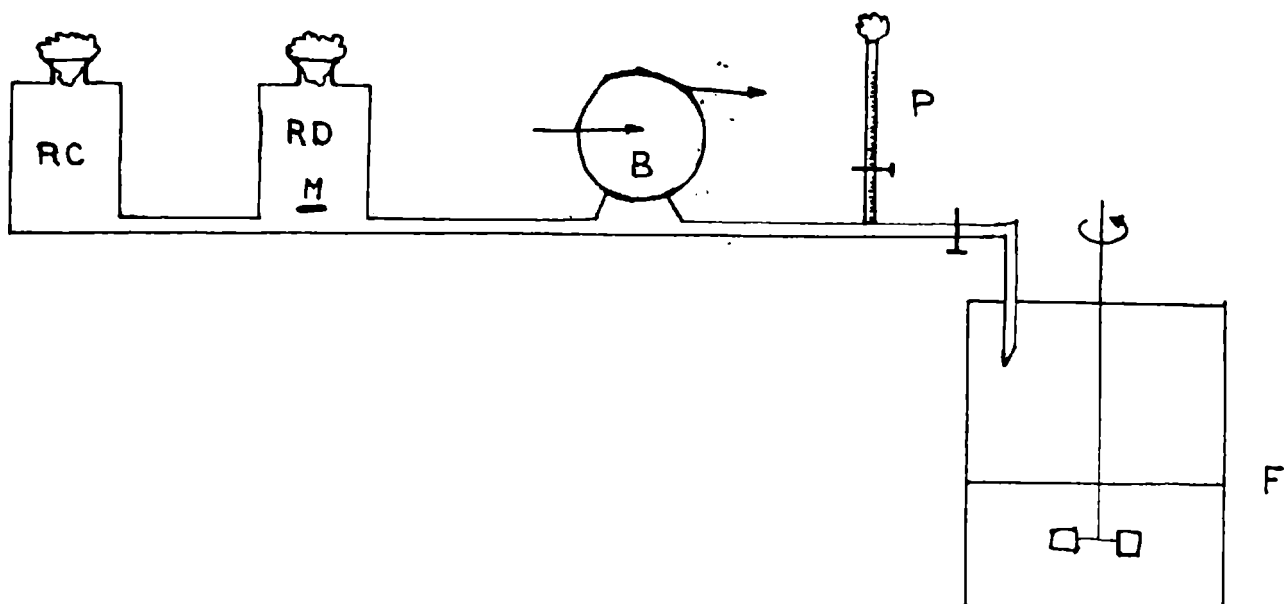
A.- Cultivos realizados con mezcla de células normales y mutantes. El esquema siguiente muestra el emplazamiento del sistema utilizado.



F: Fermentador; R: refrigerante; F.L.: frasco lavador;
SG: silicagel; DO_2 detector de O_2 ; DCO_2 : detector de CO_2 ;
caudalímetro y detector de temperatura de los gases.

B.- Cultivos discontinuos alimentados (C.D.A.):

La siguiente figura muestra un esquema del sistema utilizado en este caso



RC: Reservorio conteniendo medio de cultivo concentrado

RD: Reservorio conteniendo medio de cultivo diluído

B: Bomba peristáltica de caudal regulable

P: Pipeta graduada (medición del caudal de alimentación durante el cultivo)

F: Fermentador

M: Agitador magnético

MICROORGANISMO:

Existen varias levaduras capaces de utilizar lactosa como fuente de carbono y energía: *Kluiveromyces fragilis*, *Kluiveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida kefir*. De ellas *Kluiveromyces fragilis* posee la característica de utilizar lactosa rápidamente⁽²⁶⁾; por esta razón y además por estar aprobada por la FDA como levadura destinada a alimentación⁽⁸¹⁾, en nuestros estudios sólo se utilizó este microorganismo (*K. fragilis* NRRL Y 1109). Esta levadura utiliza la lactosa, un β -galactosido, directamente, sin previa hidrólisis, ya que posee un sistema de transporte específico. Una vez dentro de la célula, la lactosa es hidrolizada por una galactosidasa, la cual, al igual que el sistema de transporte, es inducible por β -galactosidos⁽²⁷⁾. La cinética de fermentación de la lactosa por células intactas sigue una cinética de tipo Michaelis⁽²⁷⁾.

La pared celular del *Kluiveromyces fragilis* está constituida por:⁽²⁸⁾ carbohidratos (glucanos y mananos en igual proporción) 80%; proteínas 10%, glucosamina 1%, lípidos 3,2%, fósforo (como PO_3H_2) 0,2%; siendo muy fácilmente atacable por enzimas líticas. El medio de cultivo parece no tener

influencia sobre la composición de la pared celular⁽²⁸⁾.
Cuando desarrolla en lactosa proveniente de ultrafiltración
de suero de queso posee la siguiente composición⁽⁷⁹⁾.

Proteínas (en base a fraccionamiento del nitrógeno):	37,2%
Aminoácidos azufrados	3,2 g/16 gN
Acidos nucleicos	5,7%

Como fuente de carbono puede utilizar glucosa, galactosa,
maltosa, lactosa, etanol⁽²⁹⁾, mientras que el inositol, el
pantotenato de calcio, la tiamina y el ácido nicotínico
resultan ser factores de crecimiento y por lo tanto indis-
pensables cuando se desea obtener un buen desarrollo⁽³⁰⁾.

Por observación microscópica se presentan como células
aisladas de forma ovoide, siendo sus dimensiones aproximadas
de 6 u de largo por 4 u de ancho. Si se utiliza contraste
de fase y 1000 aumentos se aprecian con claridad las vacuolas,
siendo éstas muchas y pequeñas en células jóvenes y pocas y
de mayor tamaño en células más viejas, las cuales también
se individualizan fácilmente por poseer varias cicatrices,
cada una de las cuales corresponde a una gemación

PARTE EXPERIMENTAL

OBTENCION Y EVALUACION DE UN PREPARADO PROTEICO NO CONVENCIONAL A PARTIR DE SUERO DE QUESO

El suero proveniente de la elaboración de queso contiene, término medio, 40-45 g/l de lactosa, 10-12 g/l de proteína (Nx6,38) estando el resto formado por lípidos (aproximadamente 0,7 g/l) sales minerales y vitaminas. Esta composición hace que este subproducto sea un excelente medio base para diferentes procesos fermentativos y en particular para el desarrollo de levaduras que utilicen lactosa como fuente de carbono y energía. Por lo mismo, constituye un efluente altamente polutante, lo cual se refleja en una DBO comprendida entre 30.000 y 45.000 mg.O₂/l (5 días 20°C) o bien en el hecho de que un metro cúbico de suero cause una polución equivalente a una población de 500 personas. La utilización de suero de queso por vía fermentativa para la producción de Proteínas Unicelulares es una solución de compromiso que permite, por un lado, disminuir la carga polutante de dicho efluente, y por otro, obtener proteínas que pueden ser destinadas a la alimentación animal.

En Wisconsin (USA) de 600 plantas productoras de queso, el 89% entregaban el suero a los animales como una forma de tratamiento ya que los métodos clásicos resultaban excesivamente costosos y planteaban serios problemas. Amundson C.H.⁽¹⁷⁾ propone el uso del suero de queso como medio de cultivo base para hacer desarrollar levaduras con lo que disminuye la COD (demanda química de oxígeno) de 65.000 mg/l a 10.000 mg/l. Similar resultado obtiene Wasserman y col.⁽¹⁸⁾ quienes mediante el cultivo de *Kluiveromyces fragilis* logran reducir la COD del suero en 84%.

Wasserman A.E., utilizando *Kluiveromyces fragilis* ha realizado un extenso estudio sobre producción de proteínas unicelulares a partir de suero de queso. En un primer trabajo⁽¹⁹⁾ establece las condiciones óptimas para el cultivo suplementado el suero con SO₄(NH₄)₂, PO₄HK₂ y extracto de levadura; y trabajando con inóculos grandes logra agotar el medio de cultivo en menos de 4 horas con un rendimiento de aproximadamente 50% en base a la lactosa. Por otra parte el corto tiempo de cultivo hace innecesaria la esterilización. Obtuvo idéntico resultado utilizando suero desproteinizado, lo que indica que la lactoalbúmina y la lactoglo-

bulina no son utilizadas por el microorganismo como fuente de nitrógeno. En un trabajo posterior estudia el requerimiento de oxígeno⁽²⁰⁾, midiendo el consumo por balance a la entrada y salida del fermentador (en condiciones tales que el O_2 no fuera limitante) encontrando un consumo pico de 110 ml O_2 /l/min. Este resultado indica la necesidad de contar con fermentadores que posean una elevada eficiencia en la transferencia de O_2 pues es bien conocido el hecho de que las levaduras son anaerobios facultativos, lo que les permite desarrollar en ausencia de O_2 , pero esto implica un marcado descenso en el rendimiento celular ya que el mismo varía en relación inversa al cociente respiratorio⁽²¹⁾. Esto se ve reflejado en otro trabajo del mismo autor, donde desarrolla *K. fragilis*, en un medio con suero de queso suplementado, en dos propagadores. El primero capaz de satisfacer la demanda pico de 110 ml O_2 /l/min (5mM O_2 /l/min) y el segundo con una VAO (velocidad de absorción de oxígeno) de sólo 3,4 mM O_2 /l/min. En el primer propagador se obtienen 24,7 g/l de levaduras, mientras que en el segundo sólo 15,2 g/l; la lactosa fue totalmente consumida en ambos⁽²²⁾. En trabajos más recientes sobre desarrollo de *Kluiveromyces fragilis* en suero de queso se estableció que de las variables estudiadas (aeración, agitación, concentración de lactosa, temperatura) sólo el coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 (K_{La}) y la concentración de lactosa tienen un efecto marcado sobre el rendimiento celular^(31,32). Esta última no por un efecto inhibitorio "per se" sino que a medida que aumenta su concentración también lo hace la concentración de biomasa, y si el suministro de oxígeno no es adecuado el cultivo se realiza en condiciones de anaerobiosis parcial, derivándose la lactosa principalmente hacia la formación de etanol en lugar de biomasa.

Para obtener buenos rendimientos, además de contar con un suministro de O_2 apropiado se debe suplementar el suero con alguna fuente de nitrógeno ($SO_4(NH_4)_2$, urea) ya que *K. fragilis* no es capaz de utilizar la fracción proteica coagulable por tratamiento con ácido y calor, esencialmente formado por lactoalbúmina y lactoglobulina, siendo el nitrógeno disponible el que se encuentra en la fracción no coagulable⁽²³⁾. En suma, sólo un 25% del nitrógeno total del suero es utilizado por la levadura⁽¹⁸⁾. Este último punto es de relevancia, ya que normalmente la biomasa es separada del

cultivo por centrifugación, desechándose el sobrenadante que en este caso particular contendrá proteínas de alto valor biológico. Por este motivo, se han realizado trabajos en los que las proteínas del suero son recuperadas conjuntamente con la biomasa, lo cual su vez contribuye a disminuir el poder contaminante del efluente o, en el caso de un secado total del cultivo, obviamente no se genera efluente^(24, 25).

RESULTADOS Y DISCUSION

I Estudio de medio y condiciones de operación para el cultivo de K. fragilis

1.- Fuentes de nitrógeno y factores de crecimiento:

En estas experiencias se estudió el comportamiento de dos fuentes de factores de crecimiento (Extracto de levaduras y macerado de maíz) y de dos fuentes nitrogenadas (sulfato de amonio y urea) sobre el crecimiento celular. Estas fuentes son accesibles en el mercado y su costo es reducido.

Los ensayos fueron realizados en erlenmeyers agitados de 1 litro de capacidad con 100 ml. del medio base adicionado de las fuentes de factores y de nitrógeno indicadas en el Cuadro V; las condiciones operativas son las mencionadas en materiales y métodos.

Cuadro V
Fuentes de Nitrógeno y de factores de crecimiento adicionadas al medio base.

g/l	M e d i o		N°	
	1	2	3	4
Ext. de levadura	1,0	-	1,0	-
Mac. de maíz	-	1,0	-	1,0
Urea*	-	-	1,7	1,7
SO ₄ (NH ₄) ₂	3,8	3,8	-	-

La cantidad de urea y SO₄(NH₄)₂ corresponden a un mismo tenor de nitrógeno (0,79 g/l).

* Esterilizada por separado.

Cuadro VI

Influencia de las fuentes nitrogenadas y factores de crecimiento sobre el desarrollo de *K. fragilis*.

	M e d i o N°			
	1	2	3	4
Incremento de D.O.	4,9	5,0	4,7	4,6
Lactosa consumida g/l	18,5	20,0	15,8	18,4
$\gamma = \frac{\text{UDO}}{\text{lactosa g/l}}$	0,26	0,25	0,30	0,25

En la figura 1 y cuadro VI, donde se muestran los resultados obtenidos, puede observarse que las fuentes ensayadas no presentan diferencias significativas en el desarrollo celular.

2.-Influencia de la concentración de lactosa sobre el crecimiento de *K. fragilis*.

En base a los resultados anteriores se eligió, para realizar estas experiencias, el medio que contiene sulfato de amonio y extracto de levaduras que permiten obtener soluciones limpias y no requiere la esterilización de la fuente de nitrógeno por separado. Las experiencias también se realizaron en erlenmeyers en las condiciones antes indicadas y con un medio de la siguiente composición: g/l Lactosa (variable según cuadro VII), $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; PO_4HK_2 2,5; ácido cítrico 1,09; Extracto de levaduras 1,0; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)$ 3,2. En el cuadro VII se indican los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de lactosa ensayadas.

Cuadro VII

Influencia de la concentración de lactosa sobre el crecimiento y rendimiento de *K. fragilis* en experiencias en erlenmeyers:

	M e d i o N°			
	1	2	3	4
Lactosa g/l	4	8	12	16
Máxima D.O.	2,4	3,9	4,4	4,8
$\gamma = \frac{\text{UDO}}{\text{Lactosa}}$	0,58	0,47	0,35	0,29

Esta experiencia muestra que la concentración celular, en valores de D.O., aumenta con el aumento de la concentración de lactosa. Sin embargo se observa una marcada disminución en la formación de biomasa por unidad de lactosa consumida (γ) a medida que se aumenta la cantidad de fuente de C en los medios. El parámetro γ , índice de la eficiencia de conversión de la lactosa en células, resulta máximo cuando se satisfacen las necesidades respiratorias celulares (aerobiosis) y mínimo en condiciones anaeróbicas donde buena parte de la fuente de carbono se libera al medio como etanol. Este comportamiento puede atribuirse a una deficiente aeración en los medios con mayor contenido en lactosa, por lo tanto se programó una experiencia a fin de estudiar el efecto de dicho parámetro en cultivos de *Kluiveromyces fragilis*.

3.-Influencia del suministro de oxígeno (K_{La}) sobre el crecimiento celular en medios sintéticos.

A fin de estudiar la influencia del suministro de oxígeno sobre el crecimiento y rendimiento celular se programaron experiencias en erlenmeyers con distintos valores de transferencia de O_2 . Para lograr diferentes valores de K_{La} se varió la relación volumen de medio a volumen de frasco. Se emplearon volúmenes de 50 a 400 ml. del medio indicado en el ensayo anterior con 12 g/l de lactosa. En todos los casos el volumen de los erlenmeyers fue de 1000 ml. En el cuadro N°VIII se indican los valores de K_{La} ensayados y los resultados de crecimiento y rendimiento celular obtenido.

Cuadro N°VIII
Influencia del K_{La} sobre crecimiento y rendimiento celular de *K. fragilis* en erlenmeyers.

Volumen de medio (ml)	$K_{La}(h^{-1})$	Incremento de D.O.	Lactosa consumida (g/l)	$\gamma = \frac{U.D.O.}{Lactosa}$
50	156	5,6	12,4	0,45
100	98	5,5	13,4	0,41
200	43	4,8	13,9	0,34
400	24	4,1	13,9	0,29

El cuadro de resultados muestra una estrecha relación entre K_{la} y el crecimiento y rendimiento celular. A los valores de K_{la} conducen a cultivos con mayor concentración celular y permiten además una mejor conversión de sustrato (lactosa) en biomasa.

Con el fin de estudiar el efecto de una mayor transferencia de oxígeno, y dada la dificultad de incrementar este parámetro en erlenmeyers, se realizaron experiencias en tanques agitados donde pueden alcanzarse más altos valores de K_{la} . Para tal fin se utilizó un fermentador New Brunswick de 7,5 l. de capacidad con 3 l. de medio, operando en condiciones donde la transferencia de oxígeno resulta máxima (800 r.p.m. y 1 l. aire/min; $K_{la} = 270 \text{ h}^{-1}$).

Cuadro N° IX
Desarrollo de *K. fragilis* en tanque con agitación mecánica

Tiempo de proceso (h)	D.O.	Lactosa g/l	$\frac{CO_2}{O_2}$	Peso seco g/l	$\gamma = \frac{U.D.O.}{Lactosa}$	Productividad g/l.h
0	0,45	12,0	-	0,35	-	-
2	0,69	11,3	1,08	-	-	-
4	1,75	9,4	1,05	-	-	-
5,75	3,82	6,2	1,06	-	-	-
7,50	5,70	3,4	0,97	-	-	-
9,25	6,26	0	-	4,65	0,48	0,46
11,0	6,26	0	-			

Medio de cultivo (g/l): Lactosa 12,0; $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ 0,5; PO_4HK_2 2,5; ácido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura 1,0; $SO_4(NH_4)_2$ 3,2.

Los resultados en tanque agitado indican que a pesar de operar con valores de K_{la} muy superiores a los de erlenmeyers (270 y 156 h^{-1} respectivamente) sólo se logra un ligero incremento de

crecimiento y rendimiento celular, por otra parte el cociente respiratorio $\frac{CO_2}{O_2}$ presenta, a lo largo del proceso, valores muy cercanos a la unidad. Estas consideraciones nos indican que para las condiciones empleadas en tanque agitado, la transferencia de oxígeno deja de ser el factor limitante del crecimiento de *Kluiveromyces fragilis*. De estos estudios surge la importancia también señalada por otros autores^(22,31,32) del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Kla) en el rendimiento celular (fig. N°2). Puede apreciarse en dicha figura que para las condiciones ensayadas, el rendimiento celular aumenta al aumentar el Kla, pero para valores superiores a 156 h^{-1} el rendimiento resulta muy poco afectado por dicho parámetro.

Estos resultados permiten concluir que para un medio que contiene: (g/l) Lactosa 12,00; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,5; PO_4HK_2 2,5; Ácido cítrico 1,09; Extracto de levadura 1,00 y $SO_4(NH_4)_2$ 3,2; y operando en tanque agitado a 800 r.p.m. y 1 l. aire/minuto se obtiene un cultivo aeróbico de *Kluiveromyces fragilis* con máximos rendimientos celulares.

4.-Desarrollo de *Kluiveromyces fragilis* en medios que contienen suero de queso:

a) Ensayos en erlenmeyers

Se realizaron experiencias en erlenmeyers de 1 litro con 100 ml de un medio que contiene suero de queso desproteínizado diluido al tercio, para lograr una concentración de lactosa entre el 12 - 15 g/l. Se utiliza suero desproteínizado con el objeto de poder seguir el crecimiento mediante medidas de absorbancia.

Los aspectos considerados en estos ensayos fueron:

1.- Medio constituido únicamente por suero de queso desproteínizado diluido al 1/3 y ajustado a pH 5,7.

2.- Medio constituido por: (g/l) $SO_4Mg.7H_2O$ 0,4; $SO_4(NH_4)_2$ 2,4; PO_4HK_2 2,5; Extracto de levadura 1,4; Suero desproteínizado csp 1000 ml., pH 5,7. El suero de queso con el $SO_4Mg.7H_2O$ fueron esterilizados por separado.

3.- Medio de la misma composición que la indicada en 2 pero todos los componentes esterilizados juntos. Los medios utilizados no llevan ácido cítrico ya que la capacidad reguladora del suero hace innecesaria su incorporación. Los resultados se indican en el cuadro X, donde puede observarse que el suero de queso sin

agregado de sales ni factores de crecimiento (medio N°1) no constituye un medio adecuado para el desarrollo de *Kluiveromyces fragilis*, ya que los valores de crecimiento resultaron inferiores al 50% a los alcanzados en los medios 2 y 3. Por otra parte no se observan diferencias esterilizando juntos o separados los componentes del medio. La evolución del pH es característica de este tipo de proceso donde siempre se observa acidificación con el crecimiento celular.

El rendimiento celular resulta algo inferior a los obtenidos con medio sintético, lo cual puede ser explicado por una menor transferencia de oxígeno debido a proteínas no coagulables y sales propias del suero de queso. La formación de alcohol etílico confirma la limitación del crecimiento por un suministro limitado de oxígeno.

Cuadro X
Crecimiento de *Kluiveromyces fragilis* en erlenmeyers agitados utilizando medios con suero desproteinizado

Tiempo de proceso	1			2			3		
	Lactosa D.O.	(g/l)	pH	Lactosa D.O.	(g/l)	pH	Lactosa D.O.	(g/l)	pH
0	0,13	10,7	5,53	0,14	10,7	5,41	0,14	10,9	5,4
4,5	0,37	-	5,20	0,76	9,6	5,05	0,81	9,0	5,05
8,5	1,43		4,85	3,20	1,7	4,42	3,70	1,0	4,31
12,5	2,25	2,0	4,70	4,25	0	4,25	4,40	0	4,15
$\gamma = \frac{\text{D.O.}}{\text{Lactosa}}$		0,24			0,38			0,38	
Alcohol		1,7			2,3			2,3	

b) Ensayos en fermentadores

Con el medio conteniendo suero desproteinizado (medio 2) se estudió el desarrollo de la levadura en tanque agitado, con el objeto de evaluar el consumo de oxígeno durante el proceso así

como el pico de máxima demanda a los efectos de comprobar la aeración del sistema. Las condiciones operativas fueron: r.p.m. 800; 1,0 l. aire/minuto; $K_{la} = 270 \text{ h}^{-1}$; ($VA0=1300 \frac{\text{ml } O_2}{\text{l.h}}$) volumen de medio 3 litros.

La figura 3 muestra una curva sigmoidea característica de los desarrollos microbianos que no presentan limitaciones de oxígeno. Por otra parte la curva de lactosa señala que la fuente de carbono se consume casi totalmente a las 8 horas de proceso. También se representa el consumo de oxígeno a lo largo del proceso, observándose una marcada caída coincidente con el casi total consumo de la fuente hidrocarbonada. Paralelamente se determinó la demanda de O_2 en Warburg a las 5, 8,25 y 9,25 horas de cultivo. Los valores obtenidos fueron 758, 1.239 y $103 \frac{\text{ml } O_2}{\text{l.h}}$ respectivamente. De estos valores surge que el pico de demanda coincide con el máximo consumo en tanque. La relación consumo/demanda (para los valores de máxima) resulta = 0,82. Es de destacar que a diferencia de las experiencias en erlenmeyers no se encontró alcohol etílico en el cultivo en tanque agitado, además los rendimientos celulares fueron muy superiores en tanque ($Y = 0,54$).

El análisis de los resultados obtenidos en tanque muestran coincidencias entre los valores de demanda, consumo y velocidad de absorción de oxígeno. Por otro lado la relación consumo/demanda = 0,82 señala la buena aeración del cultivo teniendo en cuenta que el máximo valor teórico posible es 1,0.

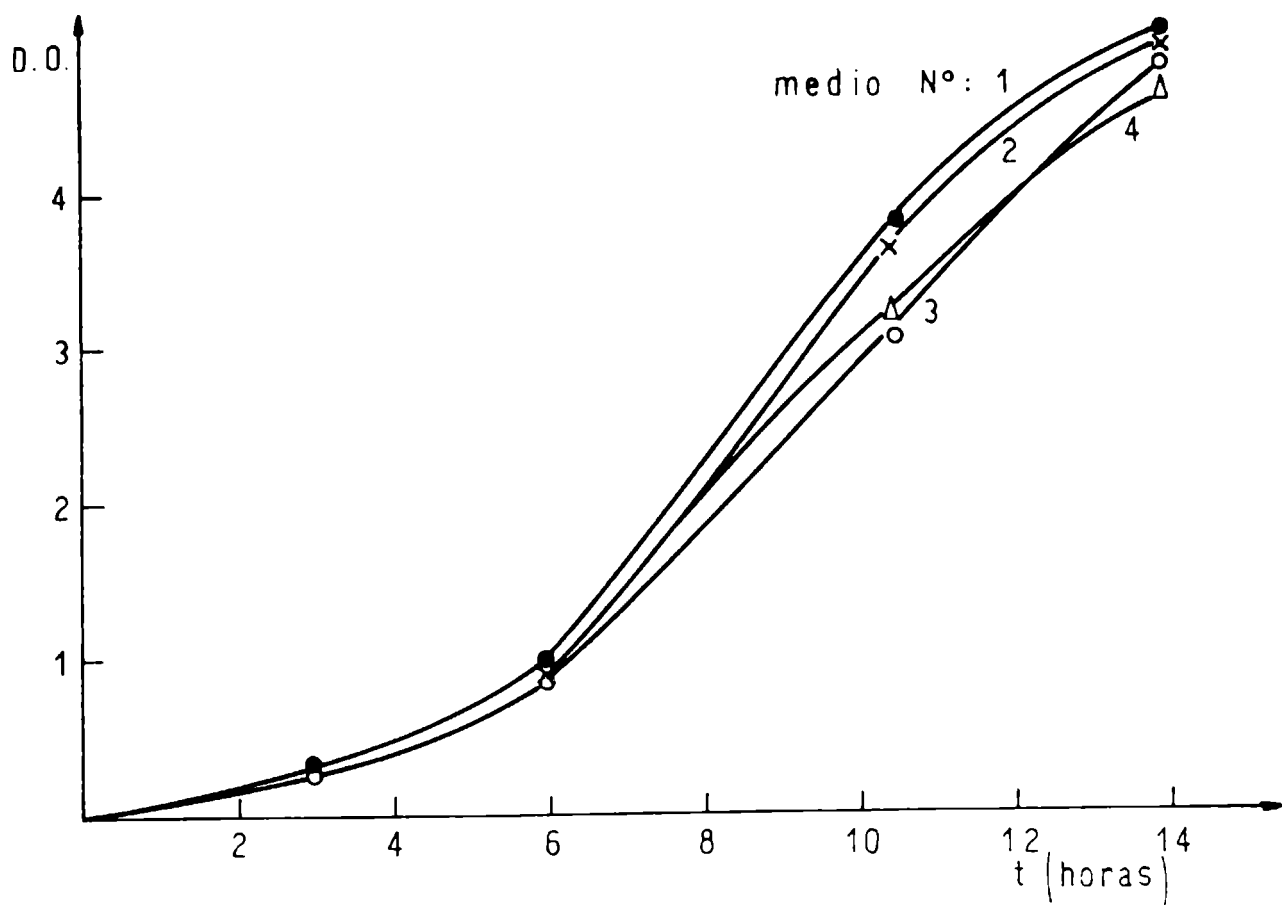


Figura 1: Influencia de la fuente de nitrógeno y factores de crecimiento sobre el desarrollo de *K. fragilis*.

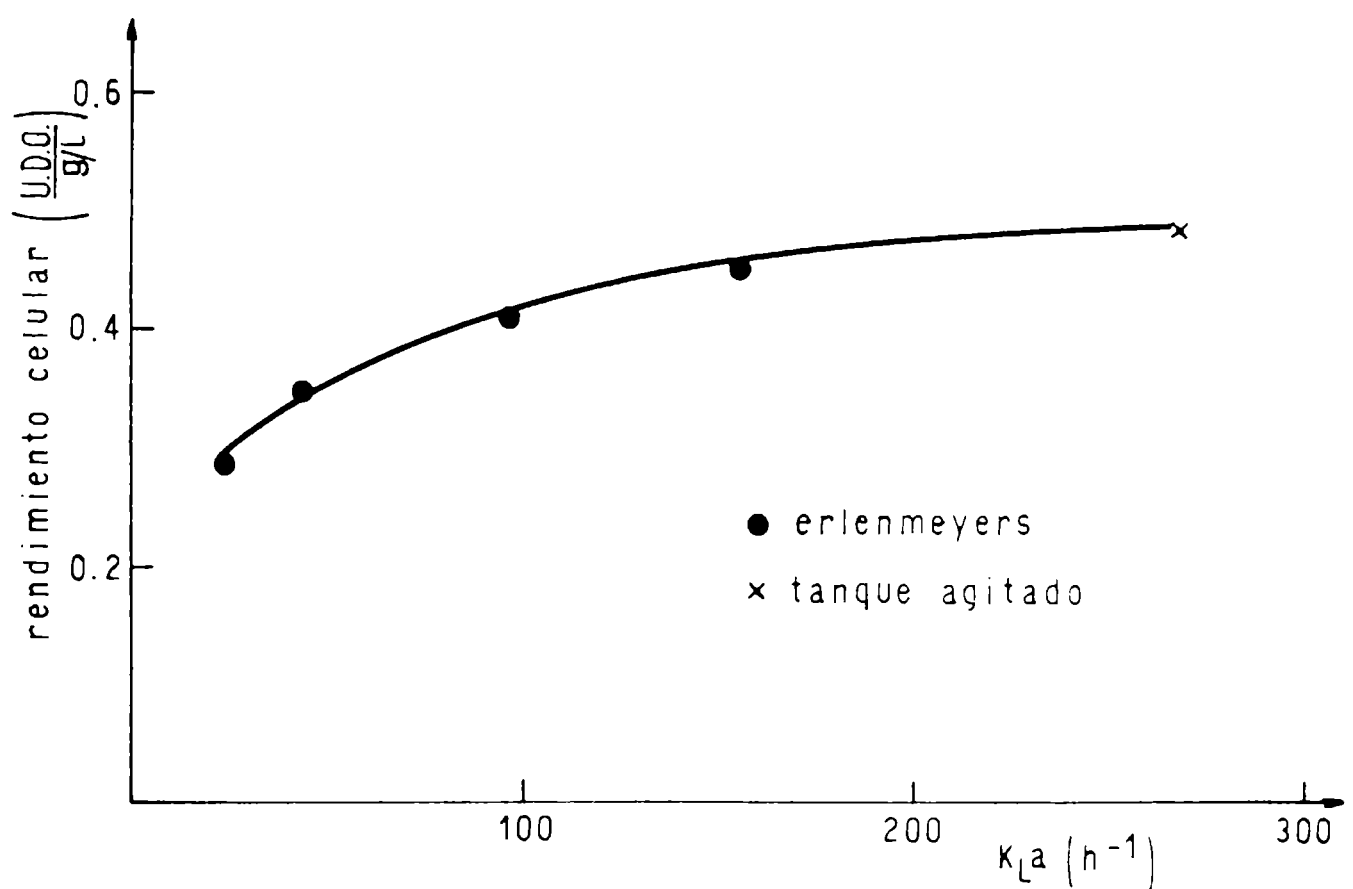


Figura 2: Efecto de la transferencia de O_2 ($K_L a$) sobre el rendimiento celular de *K. fragilis*.

II Producción de un preparado proteico en escala industrial, análisis y ensayo en animales.

El objeto de estas experiencias contempla las siguientes finalidades:

- 1.- Obtener un preparado proteico destinado a la alimentación animal a partir de un subproducto altamente contaminante como el suero de queso.
- 2.- Valorar las posibilidades como alimento del preparado proteico obtenido, determinando su valor biológico en experiencias con ratas para finalmente considerar su comportamiento, mediante estudios estadísticos, en alimentación con aves.

Los estudios de balance de medio para el cultivo de *Kluiveromyces fragilis* mostraron un comportamiento similar de las fuentes de factores de crecimiento y nitrogenadas ensayadas (fig. 1), por lo tanto al formular el medio de cultivo a utilizar en escala industrial se procedió a elegir los que en ese momento resultaban más económicos. Las concentraciones de urea y macerado de maíz se incrementaron en relación a las empleadas previamente en razón de utilizarse suero sin diluir (medio H en materiales y métodos).

Descripción del proceso de obtención del preparado proteico:

El primer problema que se presenta al trabajar en escala industrial es evitar la alteración del suero debido a la flora microbiana que acompaña a dicho suero como consecuencia del proceso a que es sometida la leche para la obtención de queso. En la figura 4 puede apreciarse cómo se modificó la composición del suero debido a la actividad de dicha flora. Al cabo de 96 horas la lactosa ha sido consumida casi totalmente, mientras que concomitantemente ha aumentado la acidez, expresada como ácido láctico, hasta 10 g/l. Esta última determinación, además de ser rápida y sencilla resulta ser particularmente sensible para evaluar el estado de conservación del suero. También puede apreciarse cómo el agregado de 0,1% de H_2O_2 de 100 volúmenes ejerce un efecto protector, al menos hasta las 96 horas. Además de ser económico, el H_2O_2 no deja residuos que pudieran interferir en el posterior cultivo⁽⁷⁸⁾.

El suero de queso utilizado en nuestras experiencias fue suministrado por una industria distante 40 Km. del lugar de trabajo.

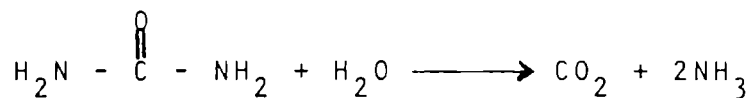
Por esta razón todas las remesas fueron adicionadas del 0,1% de agua oxigenada a fin de evitar su alteración durante el traslado y almacenamiento.

Obviamente este problema no se presenta si la fábrica de queso y la planta donde se fermenta el suero destinado a la obtención del preparado proteico están próximas.

Para la realización de la experiencia se partió de un cultivo de *Kluiveromyces fragilis* en medio de mantenimiento. De este desarrollo se repicó la cepa a tubo (agar inclinado) conteniendo medio D y de aquí se sembraron erlenmeyers de 1000 ml con 200 ml de medio G. A las 10 horas de proceso el contenido de estos erlenmeyers (en total 2 litros) se utilizó como inóculo de un fermentador de 40 litros de capacidad, con 20 litros de medio H (planta piloto). Al cabo de 10 horas el desarrollo obtenido se utilizó para sembrar un tanque de germinación con 1000 litros del mismo medio, con el cual a su vez, y luego de 10 horas, se sembró el tanque de producción propiamente dicho, conteniendo 7.000 litros de medio H.

Las condiciones de operación fueron las siguientes: En todas las etapas se trabajó con la máxima capacidad de aeración de cada equipo. El cultivo en erlenmeyers se llevó a cabo en un agitador rotatorio a 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad a 30°C. En el tanque de germinación se agitó a 200 r.p.m. con aeración de 1 l/l/min. a 30°C. Finalmente el tanque de producción de 10.000 litros de capacidad útil con 7.000 litros de medio se empleó una agitación de 80 r.p.m., siendo la aeración 0,5 l/l/min.. El cultivo se prolongó durante 11 horas y la temperatura fue de 30°C. Una vez finalizado el proceso, el producto resultante fue secado mediante un secador a rodillos calefaccionados con vapor.

En todas las etapas el medio fue esterilizado dentro del reactor a 121°C. durante 15 minutos, salvo la urea que fue esterilizada aparte a pH 4,0-4,5, ya que a pH superior a 5 se descompone según la reacción:



En la figura 5 se puede observar la evolución del cultivo en el

tiempo el cual se siguió por recuento celular, en cámara de Neubauer, No se realizaron determinaciones de peso seco ya que al esterilizar el medio de cultivo, las proteínas del suero (Lactoalbúmina y Lactoglobulina) coagulan quedando como sólidos en suspensión, conjuntamente con parte del macerado de maíz. Esto hace que carezca de sentido la determinación del peso seco para evaluar la biomasa formada, lo cual impide a su vez evaluar el rendimiento celular (peso de biomasa formada/peso de sustrato consumido). Sin embargo, tal como se mostrará más adelante, se propone un método que permite el cálculo del mismo, en base a la determinación del extracto seco, el cual comprende tanto a los sólidos disueltos como a los sólidos en suspensión.

Como se muestra en la figura 5, a las 11 horas de cultivo la lactosa fue totalmente consumida, alcanzándose un recuento de 14×10^8 cel/ml.

El producto seco resultante fue sometido a diversos análisis y el resultado de los mismos puede observarse en el cuadro XI.

El contenido de urea del preparado obtenido, (1,2 %) es atribuible a que durante el cultivo ésta no fue totalmente consumida. Por otra parte, el contenido relativamente alto de cenizas (16,5%) es debido a la forma en que fue secado el caldo fermentado, siendo esto fácilmente evitable si previo al secado se separa la fracción insoluble por centrifugación, con lo cual se eliminan las sales disueltas.

El tenor de proteínas fue evaluado por el método de Kjeldahl⁽³⁴⁾ y por la técnica del biuret⁽³⁵⁾. En este último caso se utilizaron dos proteínas como referencia para obtener la curva de calibración: gelatina y albúmina de suero bovino cristalizada. En la figura 6 se observa que la albúmina posee mayor pendiente que la gelatina. Esto podría deberse a que la gelatina posee un elevado contenido de restos de prolina e hidroxiprolina los cuales no forman complejos con el Cu^{++} ⁽³⁶⁾. Por todo esto la absorbancia por unidad de peso de gelatina es menor que la de albúmina, lo cual redundará en una sobreestimación del contenido de proteínas de la muestra cuando se utiliza la gelatina como patrón. En el cuadro XII se da la composición en aminoácidos del preparado

proteico y la suma de los mismos permite estimar también el contenido en proteína, que en este caso arroja un valor similar al determinado con la técnica del biuret cuando se utilizó albúmina de suero bovino como proteína patrón.

Debe destacarse que del porcentaje de proteínas presentes en el preparado una fracción proviene de las levaduras y otra de las proteínas del suero que han coagulado debido a la esterilización (Lactoalbúmina y Lactoglobulina).

En el cuadro N°XIV se consignan los datos referentes al valor biológico del preparado proteico. Se destaca el alto valor de digestibilidad, pero una UPN más bien baja, lo que conduce a un valor biológico relativamente bajo.

La lisina disponible conforma un 60% del total presente.

El bajo contenido de RNA es atribuible a un efecto de dilución de los componentes del suero que no fueron asimilados durante el cultivo por la levadura pero que, por la forma en que se secó el caldo, quedaron retenidos ya que la determinación de RNA sobre células en fase estacionaria cultivadas en un medio de cultivo similar (reemplazando el suero entero por suero desproteinizado) arrojó un valor de 5% p/p (seco).

Ensayos de alimentación con aves

A.- Pollos parrilleros.

En esta experiencia se estudió la incidencia de raciones balanceadas isoproteicas sobre la ganancia de peso corporal y relación de conversión en la crianza de pollos parrilleros. Para tal fin se emplearon 4 lotes de pollitos integrados cada uno al azar, por 22 machos BB de la línea comercial Ross vacunados contra la enfermedad Manek. Los lotes fueron mantenidos en compartimentos independientes en baterías de cría, recría y terminación. Los polluelos fueron mantenidos en ayunas 72 horas desde su nacimiento, con acceso exclusivo al agua de bebida, previo control de peso de cada lote. Las raciones utilizadas en estas experiencias se indican en el cuadro XV.

Se ensaya comparativamente la harina de carne, harina de pescado y la harina que proviene de la fermentación del suero ácido de queso (PPF) frente a una ración testigo integrada por

harina de carne y de pescado. La temperatura del local fue mantenida a 30°C.

Los controles de peso corporal y consumo de alimento se registraron cada 15 días. Estas experiencias tuvieron una duración de 60 días.

B. Ponedoras

Las experiencias con ponedoras tuvieron como objetivo estudiar, comparativamente entre las gallináceas, la incidencia de raciones balanceadas isoproteicas sobre la cantidad y peso de huevos producidos, peso corporal y relación de conversión, utilizando fundamentalmente como fuente esencial de aminoácidos, en los dos primeros ensayos, las harinas de pescado, carne y el preparado proteico obtenido por fermentación (PPF) en forma individual y/o consociada y en el tercer ensayo el agregado de harinas de soja y girasol.

Las experiencias se efectuaron a través de 3 etapas sucesivas sobre un total de 32 pollas de la línea comercial "Warren" de postura, ubicadas en jaulas individuales con las que se formaron al azar 4 grupos de 8 animales. Al iniciarse estas experiencias las pollas tenían 190 días de edad y fueron alimentadas con una misma ración alimenticia durante los 30 días anteriores al inicio del ensayo. A continuación de este período se mantuvieron 14 horas en ayunas para el control de peso. Las raciones utilizadas se indican en el cuadro XVI. El período correspondiente a cada ensayo sucesivo fue de 30 días, con un intervalo de 14 horas de ayuno entre cada ensayo.

Resultados de los ensayos con aves

Los resultados obtenidos en los ensayos con pollos parrilleros se muestran en el cuadro XVII donde se indica la fuente de proteína utilizada, la ganancia de peso promedio a los 60 días y la relación promedio de conversión. Los valores muestran que existe una diferencia significativa en la ganancia de peso del lote alimentado con PPF en relación a los lotes alimentados con HC* + HP** y HC. Además puede observarse que las diferencias más altamente significativas (267,38 g de peso corporal y 0,21 en relación de conversión) fueron obtenidas en los lotes alimentados con harina de carne y PPF.

* - harina de carne

** - harina de pescado

Los resultados obtenidos en los ensayos con pollas ponedoras se indican en los cuadros XVIII, XIX y XX. En el cuadro XVIII donde se compara el efecto de raciones que contienen HC, HP y PPF frente a un testigo con HC + HP, puede observarse que la capacidad de conversión (g. balanceado/g. huevo) dan valores muy semejantes, mientras que el valor promedio de postura no presenta diferencias significativas ($P > 0,05$).

En el cuadro XIX se muestran los resultados de raciones donde se consocia isoproteicamente las mismas fuentes de proteínas del ensayo anterior, con el PPF frente al mismo testigo (HC + HP). En análisis de varianza respecto de la relación ración /postura resultó ligeramente significativo ($P < 0,05$) pero al aplicar el método de Tuckey se demostró que dichas variaciones deben atribuirse al azar.

En el cuadro XX donde se incluyen harinas vegetales (soja y girasol) en las raciones, puede apreciarse del análisis de varianza que la relación ración /postura no es significativa ($P > 0,05$).

Los resultados del cuadro XIV muestran que el preparado proteico obtenido por fermentación no presenta un alto valor biológico. Este comportamiento es característico de las proteínas provenientes de levaduras debido a su bajo tenor en aminoácidos azufrados.

El bajo contenido en RNA del preparado en estudio tiene poca importancia en la nutrición animal, pero puede resultar de gran interés en la alimentación humana⁽¹³⁾.

Si bien la calidad proteica del PPF puede mejorarse por suplementación con metionina^(10,11,79), es interesante destacar que el alto contenido de lisina permite su asociación con harinas vegetales generalmente deficientes en dicho amino ácido y con buenos valores de aminoácidos azufrados, mejorando así la calidad proteica del producto resultante.

Puede resultar interesante comparar, en el caso de las ponedoras, los requerimientos diarios de aminoácidos⁽⁴²⁾ en relación a la composición del preparado proteico (Cuadro XIII). Para una mejor comparación se le asignó a la histidina el valor de 1 (uno) siendo la composición de aminoácidos relativa a este valor. Se observa que tanto el contenido de lisina (el valor tabulado corresponde a lisina disponible) como el de aminoácidos azufrados del

preparado, están en una relación bastante cercana a las que requieren las aves, y algo similar ocurre con una buena parte de los aminoácidos restantes. Esta podría ser una de las causas por las que el preparado mostró ser capaz de reemplazar fuentes de nitrógeno tradicionales en los balanceados para ponedoras con buenos resultados.

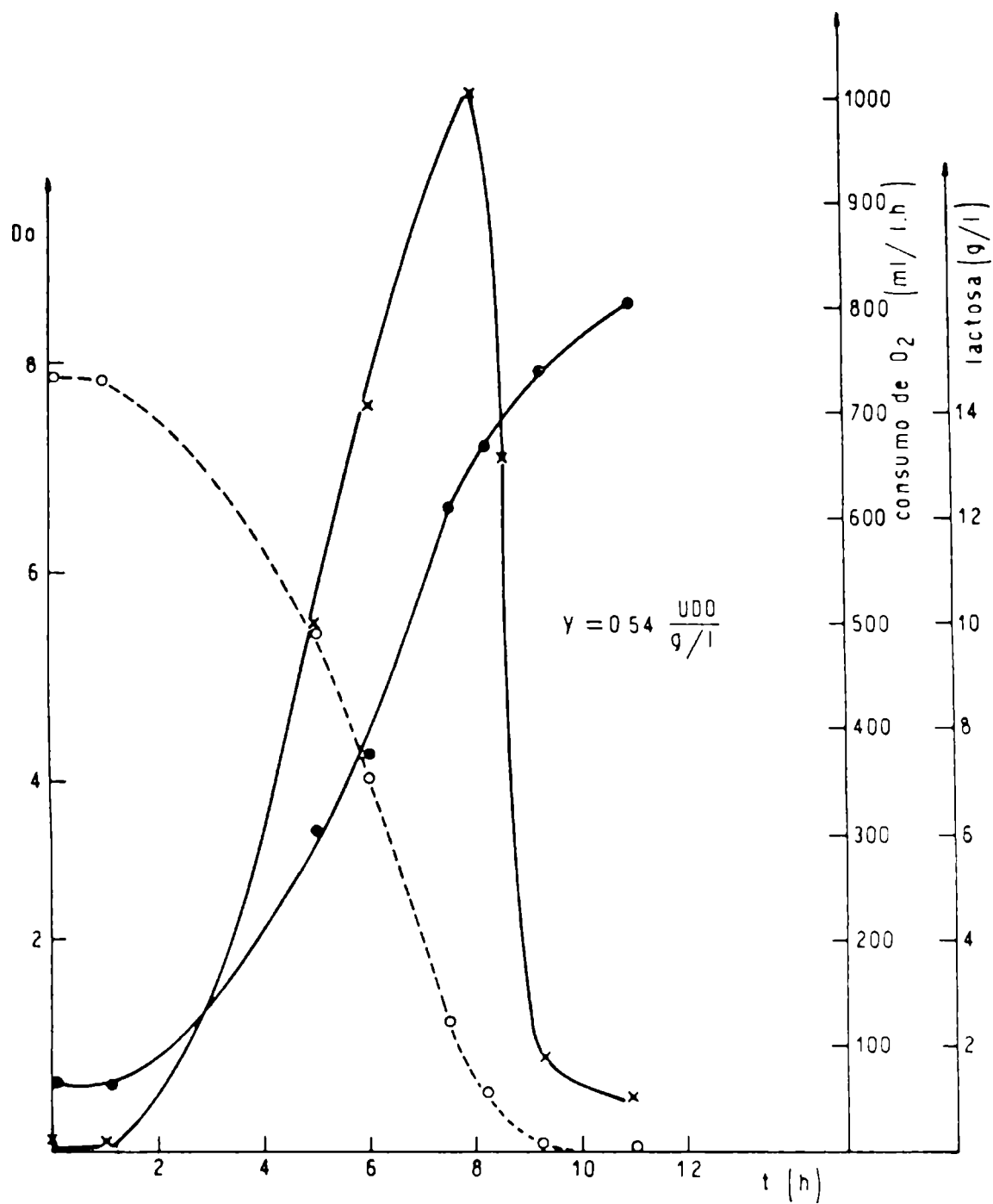


Figura 3: Crecimiento celular (●), consumo de O_2 (x) y consumo de lactosa (O) durante un cultivo de *K. fragilis* en tanque agitado en un medio conteniendo suero desproteínizado suplementado. Agitación 800 RPM, aeración 0,3 l/l/min..

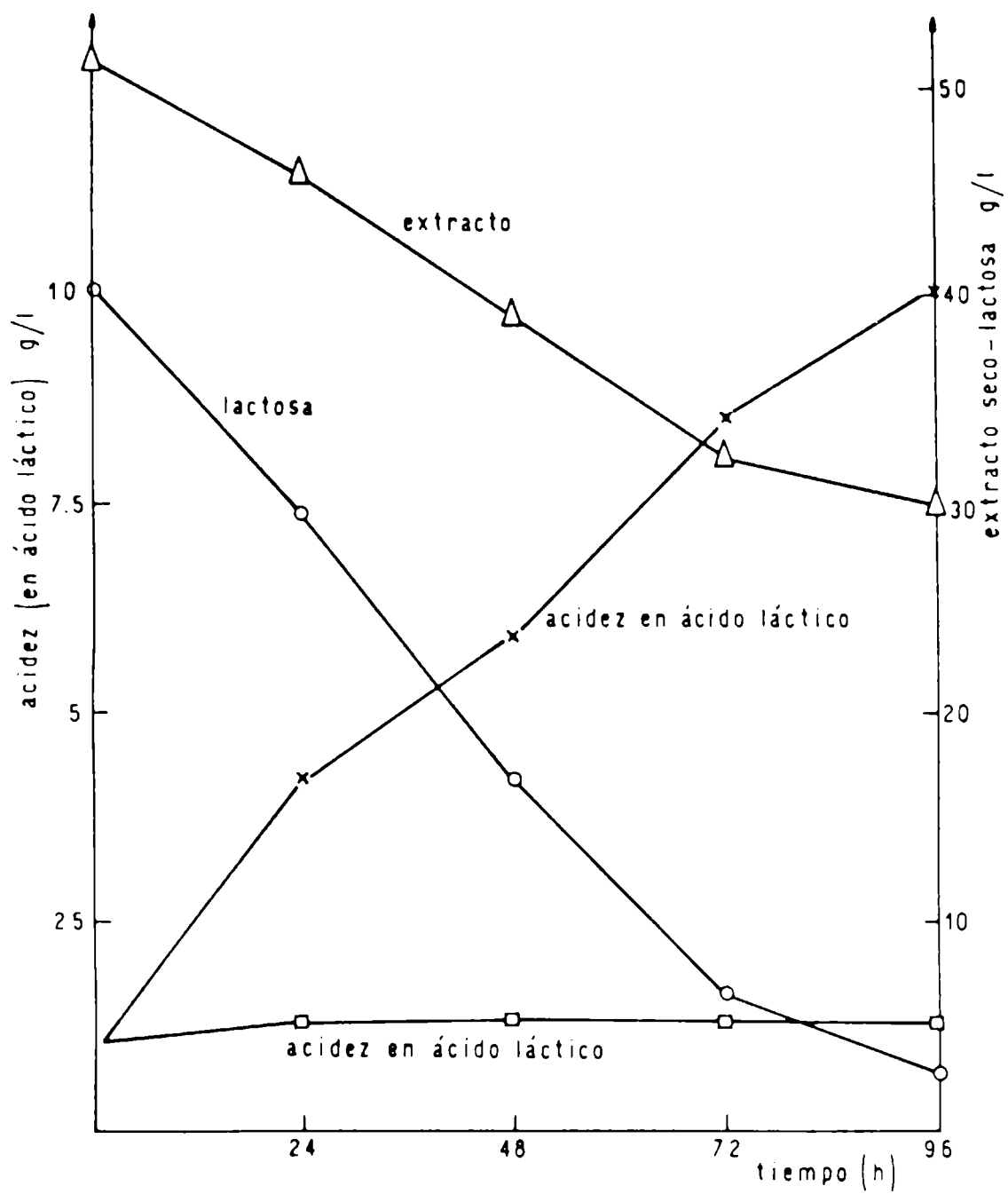


Figura 4: Estabilidad del suero de queso en función del tiempo. (Δ) Extracto seco (g/l). (x) Acidez en ácido láctico. (O) Lactosa (g/l). (\square) Acidez en ácido láctico (agregado de H_2O_2 0,1%).

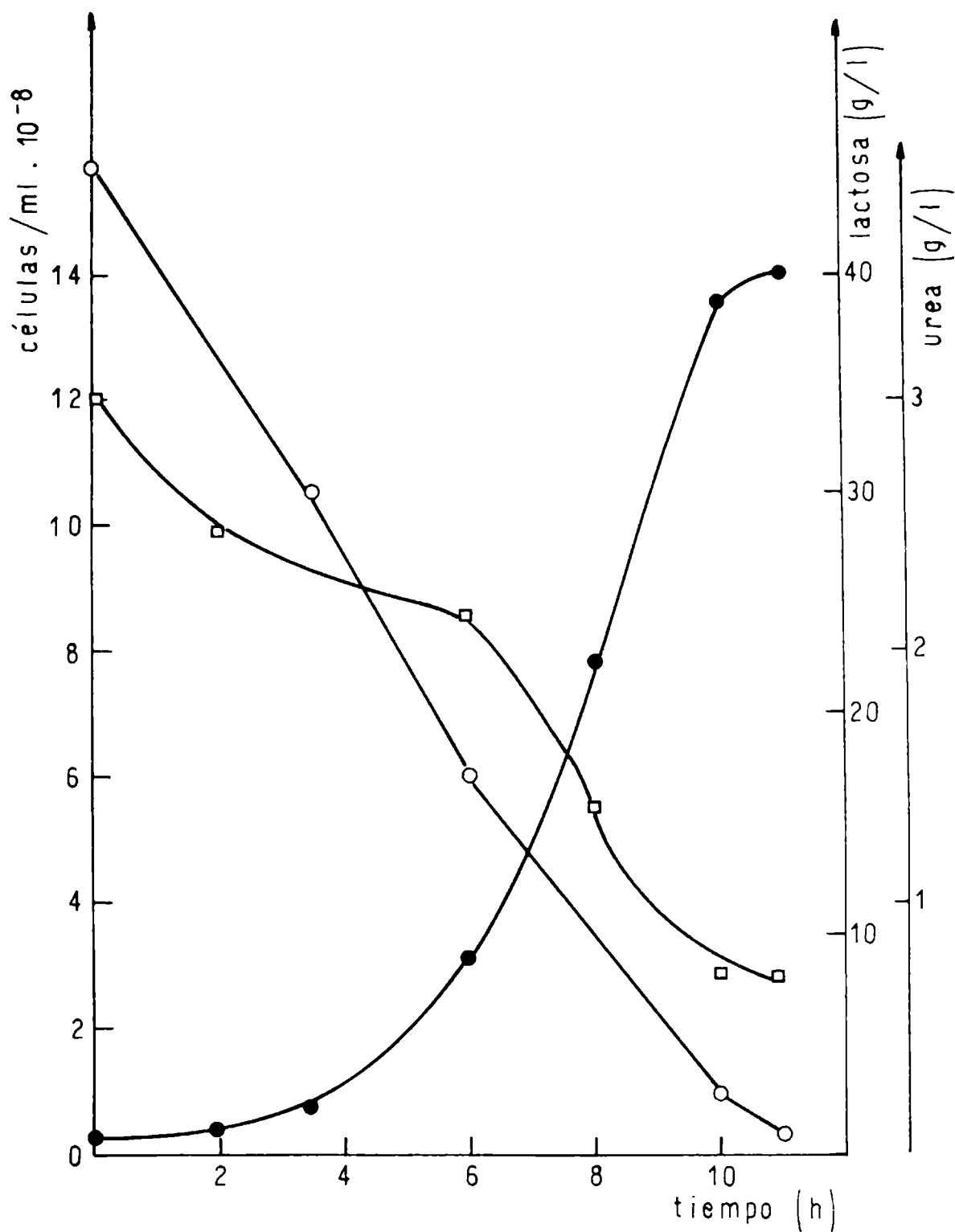


Figura 5: Cultivo de *K. fragilis* en fermentador de 10.000 l. de capacidad. (○) Lactosa; (□) Urea; (●) Recuento celular. Medio H (g/l): Urea 3,0; PO_4HK_2 1,5; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,15; Macerado de maíz (sólido) 2,0; Suero de queso CSP 1000 ml; pH = 5,5-5,7. Volumen de cultivo: 7.000 l. Agitación 80 RPM. Aeración $0,5 - 1,0 \frac{\text{l}}{\text{l} \cdot \text{min}}$ Temperatura 30°C.

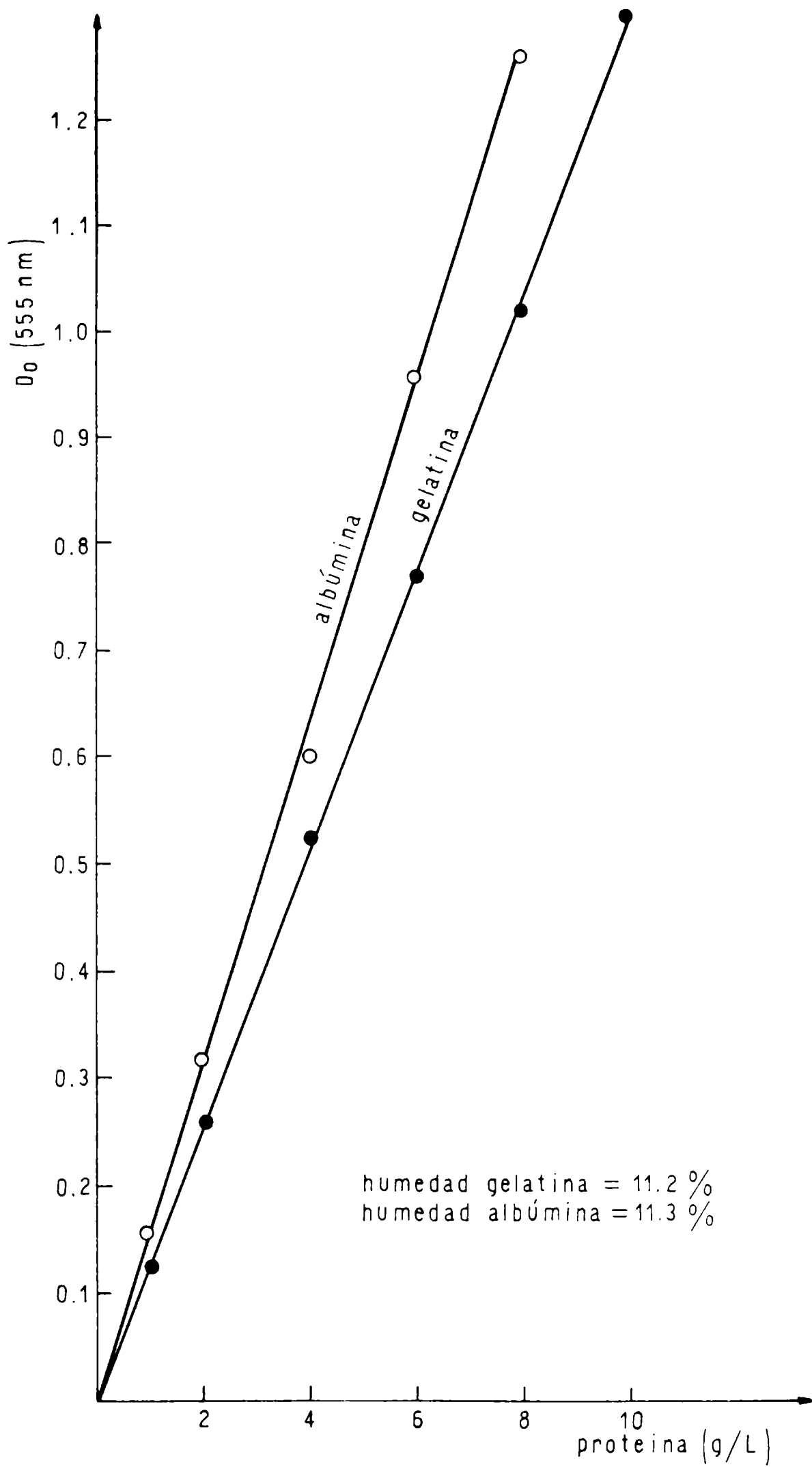


Figura 6: Curvas de calibración para la técnica del biuret utilizando albúmina de suero bovino cristalizado y gelatina como proteínas patrón.

Cuadro XI

Composición del preparado proteico obtenido por fermentación

	Gramos % (base seca)
Urea -----	1,2
Amoníaco -----	0,1
N x 6,25 -----	47,8
Proteínas -----	46,5 (testigo Gelatina)
Proteínas -----	40,8 (testigo Albúmina de suero bovino)
Suma de aminoácidos -----	40,6
Lactosa -----	0,4
Grasas -----	8,5
Cenizas -----	16,5
Ca -----	0,81
Mg -----	0,48
P -----	2,1
Na -----	1,0
(Humedad -----	6,8%)

Cuadro XII

Composición de aminoácidos del preparado proteico

	% P/P (húmedo)
Fenilalanina -----	1,7
Tirosina -----	1,4
Leucina -----	3,3
Isoleucina -----	1,8
Metionina -----	0,64
Valina -----	2,0
Cistina -----	0,46
Alanina -----	2,8
Glicina -----	1,5
Prolina -----	2,1
Glutámica -----	7,3
Serina -----	1,9
Treonina -----	2,1
Aspártico -----	4,0
Arginina -----	1,5
Histidina -----	0,68
Lisina -----	2,7
(Humedad -----	6,8%)

Cuadro XIII

Comparación entre los requerimientos diarios de aminoácidos para
ponedoras y la composición del preparado proteico.

Aminoácido	Requerimientos relativos	Composición relativa del P. Proteico
Lisina	2,25	2,8
Met.	1,05	0,93
Met. y Cist.	1,86	1,62
Trip.	0,55	0,68
Arg.	2,5	2,12
Hist.	1,0	1,0
Fenal.	2,30	2,4
Fenal. y Tir.	3,30	4,4
Treo.	1,86	3,0
Leu.	3,5	4,6
Ileu.	2,11	2,5
Val.	2,13	2,8
Gli.	1,67	2,0

$$\text{Hist.} = 360 \frac{\text{mg} +}{\text{Ave.día}} = 1$$

$$\text{Hist.} = 1,6\% = 1$$

Cuadro XIV

Valor biológico del preparado proteico

RNA ----- 1,63% (base seca)
 Lisina disponible ----- 3,79g/16 g N
 UPN (Utilización Proteica Neta) -----41,46
 D (Digestibilidad) -----85,62
 Valor Biológico = $\frac{\text{UPN}}{\text{D}} \cdot 100 = 55$

Cuadro XV

Formulación de raciones correspondientes a los ensayos de alimentación con pollos parrilleros

Grupos	I	II	III	IV
Componentes	(HC + HP) kg	(HC) kg	(HP) kg	(PPF) kg
Harina de maíz	30	30	30	30
Sorgo molido	20	18,817	21,289	16,570
Afrechillo de trigo	20	20	20	20
Afrecho de trigo	3	3	3	3
Harina de avena	4	4	4	4
Harina de carne (50/55)	10	19,183	--	--
Harina de pescado	8	--	16,711	--
Prep. prot. obt. por ferment.--		--	--	21,330
Harina de hueso	2	2	2	2
Conchilla molida fina	1,500	1,500	1,500	1,500
Sal (NaCl)	0,400	0,400	0,400	0,400
Núcleo Vitam/Mineral	1,100	1,100	1,100	1,100
Proteína Bruta Total	20,664	20,532	20,807	20,283

HC: Harina de Carne - HP: Harina de Pescado - PPF: Preparado proteico obtenido por fermentación.

Formulación de raciones correspondiente a los ensayos de alimentación con pollas ponedoras

COMPONENTES	P R I M E R E N S A Y O			S E G U N D O E N S A Y O				T E R C E R E N S A Y O				
	A (HC+HP)	B (HC)	C (HP)	D (PPF)	E (HC+HP)	F (HC+PPF)	G (HP+PPF)	H (HC+HP+PPF)	I (HC+PPF+ HS+HG)	J (HP+PPF+ HS+HG)	K (HP+HS+HG)	L (PPF+HS+HG)
Harina de maíz	30	30	30	30	30	30	30	30	35	35	35	35
Sorgo molido	20	19,400	20,910	18,050	20	18,730	19,475	19,456	25,036	25,277	25,738	24,816
Afrechillo de trigo	24	24	24	24	24	24	24	24	8	8	8	8
Afrecho de trigo	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Harina de avena	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Harina de carne 50/55	7	11,600	-	-	7	5,795	-	3,863	1,872	-	-	-
Harina de pescado	4	-	10,090	-	4	-	5,050	3,365	-	1,631	3,262	-
Prep.prot.obt.por ferm.	-	-	-	12,950	-	6,475	6,475	4,316	2,092	2,092	-	4,184
Harina de hueso	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Conchilla molida fina	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500	4,500
Sal fina	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
Núcleo Vitam/Mineral	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100
Harina de soja	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	9	9
Harina de girasol	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4

Hc = Harina de carne; HP = Harina de pescado; HG = Harina de girasol; HS = Harina de soja

PPF = Preparado proteico obtenido por fermentación.

Cuadro XVII

Resultados de ensayo de alimentación con pollos parrilleros

Grupo N°	Fuente de proteína animal	Ganancia de peso prom. en 60 días	Diferencia de peso prom. con relación a PPF (g)	Relación promedio de conversión	Diferencia de la relación de conversión respecto de PPF
I	H. de Carne + H. de Pescado	1.650,04	-116,62	1: 2,44	-0,02
II	H. de Carne	1.499,28	-267,38	1: 2,63	-0,21
III	H. de Pescado	1.753,50	-13,16	1:2,43	-0,01
IV	Prep. Proteico obtenido por Fermentación	1.766,66	---	1: 2,42	---

Cuadro XVIII
Resultados de ensayos de alimentación con pollas ponedoras

P R I M E R E N S A Y O				
LOTE	A	B	C	D
Fuente de proteína animal	HC + HP	HC	HP	PPF
Proteína Bruta total	17,387	17,320	17,438	17,170
Postura \bar{X}	25,75	25,62	26,12	24,75
Postura (o/o)	85,83	85,41	87,08	82,50
Peso del Huevo (\bar{X})	54,93	52,63	54,80	55,26
CONVERSION:				
1 huevo: g. alimento	1:136,6	1:136,8	1:136,9	1:140,8
12 huevos: kg. alimento	1:1,639	1:1,641	1:1,643	1:1,690
Peso Corporal: Diferencia \bar{X} (inicial/final)	+ 30 g	- 7,5 g	- 21,2 g	+ 23,1 g

Análisis Varianza, Tipo Ración: Postura ($P > 0,05$) C.V. = 11,62%

HC : Harina de carne - HP : Harina de pescado

PPF : Preparado proteico obtenido por fermentación

Cuadro XIX
Resultados de ensayos de alimentación con pollas ponedoras

S E G U N D O E N S A Y O

LOTE	E	F	G	H
Fuente de Proteína Animal	HC+HP	HC+PPF	HP+PPF	HC+HP+PPF
Proteína Bruta Total	17,387	17,246	17,382	17,326
Postura \bar{X}	26,00	26,00	26,25	26,62
Postura (o/o)	86,67	86,67	87,50	88,75
Peso del Huevo (\bar{X})	55,35	55,55	54,19	53,49
CONVERSION:				
1 huevo: g. alimento	1:137,6	1:133,0	1:136,9	1:133,6
12 huevos: kg. alimento	1:1,651	1:1,596	1:1,643	1:1,603
Peso corporal: Diferencia \bar{X} (inicial/final)	+35,0	-11,9	-3,2	+57,5

Análisis Varianza, Tipo Ración: Postura ($P < 0,05$) C.V. = 9,84%
 HC: Harina de Carne - HP: Harina de Pescado
 PPF: Preparado proteico obtenido por fermentación

Cuadro XX
Resultados de ensayos de alimentación con pollas ponedoras

T E R C E R E N S A Y O

LOTE	I	J	K	L
Fuente de Proteínas	HC+PPF+HS	HP+PPF+HS	HP+HS	PPF+HS
Proteína Bruta Total	17,344	17,314	17,425	17,323
Postura \bar{X}	24,00	20,37	23,28	23,87
Postura (o/o)	80,00	67,92	77,60	79,57
Peso del Huevo (\bar{X})	57,84	59,81	56,91	55,08
CONVERSIÓN: 1 Huevo: g. alimento 12 Huevos: Kg. alimento	1:126,1 1:1,513	1:146,8 1:1,762	1:125,6 1:1,507	1:118,9 1:1,427
Peso corporal: Diferencia \bar{X} (inicial/final)	-28	+13	-11,8	+3

Análisis de Varianza, Tipo Ración: Postura ($P>0,05$) C.V. = 14,88%

HC = Harina de Carne; HP + Harina de pescado; PPF = Preparado proteico obtenido por fermentación

HS = Harina de Soja

ESTIMACION DEL RENDIMIENTO CELULAR EN CULTIVOS QUE CONTIENEN SÓLIDOS EN SUSPENSION

Uno de los parámetros, si no el más importante, a determinar en la producción de biomasa, es el rendimiento celular, esto es: peso de biomasa formada por unidad de peso de sustrato (fuente de carbono y energía) consumido, frecuentemente simbolizado por la letra Y. El objetivo primordial en la producción de biomasa es obtener el mayor rendimiento posible (usualmente rendimiento del orden de 0,5 son considerados muy buenos) por lo que la estimación de este parámetro se hace imprescindible.

Cuando en el medio de cultivo no existen sólidos en suspensión, la determinación del Y es fácil, ya que por centrifugación se puede separar la biomasa del medio de cultivo para, posteriormente, evaluar su peso seco. Cuando existen sólidos en suspensión, como frecuentemente ocurre en medios de cultivo industriales, la estimación de la concentración de biomasa ya no es posible por este método, y, por lo tanto, la determinación del rendimiento. Podría pensarse que si se conoce la concentración de sólidos disueltos, por sustracción de dicho valor de determinaciones posteriores de peso seco, se obtendría la concentración de biomasa, pero tal forma de cálculo presupone que no existe ningún efecto solubilizante de los microorganismos, es decir que los sólidos en suspensión se comportarían como material inerte desde este punto de vista, lo cual obviamente no es correcto ya que de serlo no tendría sentido la formulación de un medio de cultivo que los tuviera como integrantes. Por ejemplo, es frecuente el uso de harina de soja como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo aunque ésta sea insoluble ya que el microorganismo ejerce una acción solubilizante a través de una acción enzimática; finalmente la fracción solubilizada es incorporada a la biomasa.

El método que aquí se propone se basa en el siguiente razonamiento: supongamos que se realiza un cultivo de un microorganismo cualquiera en un medio que contiene sólidos en suspensión y que (ver fig. 7) SS representa a los sólidos en suspensión, SD a los sólidos disueltos y X a la biomasa. El extracto seco, E, incluye tanto a SS como a SD y a X, luego en la figura 7 corresponderá a la totalidad del círculo. Ahora bien, si consideramos al extracto seco como un sistema, es obvio que si una

cierta fracción, f , de SS es solubilizada y posteriormente incorporada a la biomasa, X , el valor de E no se modificará, ya que la cantidad de materia que desaparezca de SS aparecerá en SD y/o en x , por tanto el valor de E permanecerá invariable.

En SD está incluida la fuente de carbono y energía (se supone soluble, aunque si no lo fuese el razonamiento no se altera) la cual generalmente es un hidrato de carbono y ésta es la parte del sistema que intercambia materia y energía con el entorno, más precisamente la fracción de sustrato carbonado que se utiliza como fuente de energía ya que la otra fracción (fuente de carbono) queda retenida en el sistema.

Fig. 7:

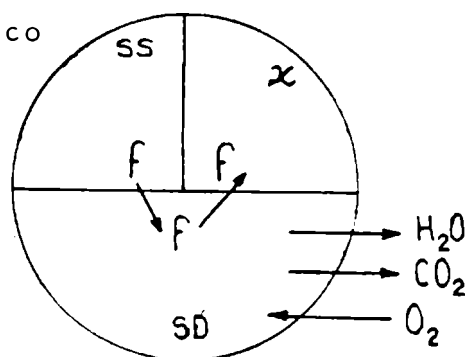
El círculo representa al extracto seco

SS: sólidos en suspensión

SD: sólidos disueltos

X: Biomasa

f : fracción solubilizada



En base a lo expuesto, el extracto seco, en cada instante, estará dado por:

$$E = S + X + I + P \quad (1)$$

E = Extracto seco (P/V)

S = Fuente de carbono y energía (P/V)

X = Biomasa (P/V)

P = Producto no volátil (P/V)

I = Sustancias que se comportan como inertes (P/V)

La ecuación (1) supone que el volumen de cultivo no se modifica con el tiempo, tal cual sucede en un cultivo en batch. El valor de I engloba tanto a los sólidos disueltos (a excepción de S) y en suspensión (a excepción de X) que se comportan como inertes en el sentido de que dentro del sistema (E) permanecen constantes. Por otra parte P representa algún producto no volátil ocasionalmente formado como consecuencia de la actividad metabólica del microorganismo.

De la ecuación (1) pueden surgir distintos casos según las



suposiciones que se hagan:

1.- No se forma P e **I** realmente se comporta como inerte.

En estas condiciones: $E = S + X + \mathbf{I}$ (2)

y: $dE = dS + dX$ (3) ($d\mathbf{I} = 0$)

Por otra parte el rendimiento celular se define como:

$$Y = \frac{-dX}{dS} \quad dX = -YdS \quad (4)$$

Reemplazando el valor de dX en (3) por el de (4)

$$dE = dS - YdS$$

$$dE = dS (1 - Y) \quad (5) \quad Y = 1 - \frac{dE}{dS} \quad (6)$$

Si se integra la (5) queda (suponiendo $Y = \text{constante}$)

$$\int_{E_0}^E dE = (1-Y) \int_{S_0}^S dS ; \quad E - E_0 = (1-Y)(S - S_0) \quad (7)$$

La ecuación (7) tiene inmediata aplicación práctica pues está en función de magnitudes medibles; además si el rendimiento realmente se mantuvo constante durante todo el cultivo, la gráfica de $(E_0 - E)$ vs $(S_0 - S)$ deberá ser una recta cuya pendiente será: $1 - Y$.

Si se calcula el rendimiento global de un cultivo, es decir considerando los valores iniciales y finales, el rendimiento queda expresado como

$$Y = \mathbf{I} - \frac{\Delta E}{\Delta S} \quad (8) \quad \begin{aligned} E &= E_f - E_0 \\ S &= S_f - S_0 \end{aligned}$$

2.- Se forma algún producto P, no volátil.

I = inerte

La ecuación (1) para un cambio infinitesimal queda expresada como:

$$dE = dS + dX + dP \quad (9)$$

Además $dX = -YdS$

$$dP = -Y_p dS$$

Reemplazando:

$$\begin{aligned} dE &= dS (1 - Y - Y_p) \\ Y + Y_p &= 1 - \frac{dE}{dS} \end{aligned} \quad (10)$$

3.- $P = 0$

I no se comporta como inerte.

Esto puede ocurrir en medios de cultivo donde la fuente de carbono y energía es el sustrato limitante y la fuente de nitrógeno, en exceso, susceptible de ser utilizada como fuente de energía (ej. aminoácidos).

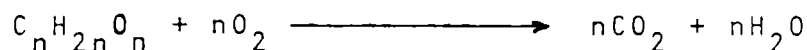
En este caso $dI \neq 0$; $dI < 0$

$$dE = dS + dX + dI \qquad \frac{dE}{dS} = 1 - y + \frac{dI}{dS}$$

$$y - \frac{dI}{dS} = 1 - \frac{dE}{dS} \quad (11)$$

Extracto seco e intercambio de materia:

Otro aspecto que debe ser considerado, es el intercambio de materia con el entorno, el cual se realiza a través de la oxidación de la fuente de carbono y energía. Si suponemos que ésta es un hidrato de carbono se tendrá:



De esta reacción surge que:

$$\frac{n CO_2}{n O_2} = 1,375 \text{ g/l}; \quad \frac{n H_2 O}{n O_2} = 0,562 \text{ g/g}$$

El balance de materia para el sistema, E, será: (ver fig. 7)

$$V \cdot dE = V (dM_{O_2} - dM_{CO_2} - dM_{H_2O}) \quad (12)$$

Donde:

M_{O_2} = masa de O_2 (P/V) consumido

M_{CO_2} = masa de CO_2 (P/V) producido

M_{H_2O} = masa de H_2O (P/V) producida

V = volumen de cultivo

El efecto de dilución del volumen de cultivo debido al H_2O formado por la reacción es despreciable, por tanto se puede considerar que V sigue siendo constante; luego:

$$dE = dM_{O_2} - dM_{CO_2} - dM_{H_2O}$$

$$\frac{dE}{dM_{O_2}} = 1 - \frac{dM_{CO_2}}{dM_{O_2}} - \frac{dM_{H_2O}}{dM_{O_2}} \quad (13)$$

Reemplazando por las relaciones halladas anteriormente

$$\frac{dE}{dM_{O_2}} = 1 - 1,357 - 0,562$$

$$\frac{dE}{dM_{O_2}} = -0,937 \quad (14) \text{ o bien } \frac{\Delta E}{\Delta M_{O_2}} = -0,937 \quad (15)$$

Puesto que ΔM_{O_2} es mayor que cero (porque el O_2 ingresa al sistema) se tiene que ΔE , para un hidrato de carbono, siempre será menor que cero; es decir que E disminuye con el tiempo.

A la misma conclusión se llega partiendo de la ecuación (8); ya que si Y es menor que 1, como ocurre para hidratos de carbono, ΔE tiene que ser menor que cero, ya que ΔS también lo es.

La ecuación (14) se deduce a partir de la reacción de oxidación del sustrato, donde se supone que O_2 sólo es utilizado para dicha oxidación, sin embargo esto implica que el estado redox del carbono en el sustrato y en la biomasa son comparables. Por ejemplo si consideramos que el sustrato es un hidrocarburo, habrá un consumo de O_2 para la reacción de oxidación que provee energía a la célula, y otro, extra, para llevar el estado redox del carbono al mismo estado que se encuentra en la biomasa, en tal caso esto debe ser considerado en el balance.

Para hidratos de carbono tal suposición, igual estado de oxidación del C. en el sustrato y la biomasa, no está alejada de la realidad, ya que el estado redox del carbono en este caso es de 4 y el porcentaje de carbono 40% y para la biomasa 4,2 ($\pm 2\%$) y 46% ($\pm 4\%$) respectivamente. ⁽⁴³⁾

La ecuación (15) está en función de parámetros medibles y por tanto permite verificar el mayor o menor grado de cumplimiento del sistema con las suposiciones hechas ya que $-\frac{\Delta E}{\Delta M_{O_2}}$ debe ser $\approx 0,9$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para verificar la validez de las suposiciones hechas se trabajó con medios de cultivo sin sólidos en suspensión (esto no altera en nada todo lo expuesto ya que en este caso I incluirá sólo a los sólidos disueltos a excepción de la fuente de carbono) lo cual permite evaluar el rendimiento celular ($-\Delta X/\Delta S$) y además planear experiencias en las que "I" no se comporta como inerte.

En el cuadro XXI se observa la evolución de los distintos parámetros del cultivo, entre ellos el extracto seco E que, como cabe esperar, disminuye en función del tiempo. El cultivo se realizó con el medio A en un fermentador New Brunswick de 5 litros de capacidad con 1,6 litros de cultivo a 400 rpm, 30°C y una aeración de 1 l/min.. Previo a su ingreso al fermentador el aire fue humidificado a la temperatura de trabajo haciéndolo burbujear en agua estéril con el objeto de evitar una concentración del medio de cultivo debido a la evaporación de agua que se produciría, lo cual causaría una sobreestimación del extracto seco. El fermentador se sembró con un cultivo, en medio A, proveniente de un desarrollo de K fragilis en erlenmeyer (X 1000 ml.) con 100 ml. de cultivo incubado en agitador rotatorio 15 hs. a 30°C.

Cuadro XXI

Valores experimentales de un proceso de desarrollo de K. fragilis

Tiempo (h)	pH	X(g/l)	S(g/l)	E(g/l)	E _o -E(g/l)	S _o - S(g/l)
0	5,75	0,43	6,1	10,0	0	0
1,5	5,60	0,64	5,8	9,9	0,1	0,3
3	5,40	1,12	5,3	9,4	0,6	0,8
5	5,25	1,94	3,7	8,91	1,09	2,4
6,5	4,95	2,82	1,2	7,68	2,32	4,9
8	4,95	3,51	0	-		6,1
9,3	5,20	3,67	0	7,20	2,80	6,1

X = Concentración de biomasa (g/l; S = Concentración de lactosa (g/l)
E = Extracto seco (g/l). Medio A: (g/l): Lactosa 6,0; SO₄Mg.7H₂O 0,2; PO₄HK₂ 1,25.

Acido cítrico monohidratado 0,55; Extracto de levadura 2,0; Triptosa 1,5; pH 5,7 - 5,5.

El rendimiento global fue: $Y = \frac{-\Delta X}{\Delta S} = \frac{3,24 \text{ g/l}}{6,1 \text{ g/l}} = 0,53$

y el calculado por el método propuesto $Y = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} = 1 - \frac{2,80}{6,1} = 0,54$

En esta experiencia el rendimiento, Y, se mantuvo razonablemente constante (no ocurrió lo mismo con otras) lo cual se refleja en la figura 8 donde los puntos de la gráfica de E_o- E vs. S_o- S se ajusta bien a una recta que prácticamente pasa por el origen cuya ecuación es (mínimo cuadrados):

$$E_o - E = 0,455 (S_o - S) + 0,05$$

Según la ecuación (7) la pendiente de dicha recta es: 1 - Y; luego Y = 0,54; valor que concuerda con el rendimiento global anteriormente calculado. De todos modos este procedimiento, si bien más elegante, resulta poco práctico ya que raras veces el rendimiento se mantiene constante durante un cultivo de batch y además lo que interesa calcular es el rendimiento global, lo cual puede realizarse con un par de pesadas.

Esta experiencia se repitió para verificar los resultados obtenidos. En el cuadro XXII se pueden apreciar los resultados, y en este caso la gráfica de E_o- E vs. S_o- S si bien no da una recta, los rendimientos globales calculados por ambos métodos coinciden.

Cuadro XXII

Valores experimentales de un proceso de desarrollo de K. fragilis

Tiempo (h)	pH	X	E	S	E _o - E	S _o - S
0	5,55	0,36	9,14	5,85	0	0
2	5,30	0,64	9,04	5,80	0,1	0,05
3	5,15	0,89	8,96	5,4	0,18	0,45
4	5,15	2,10	8,58	3,20	0,56	2,65
5	4,75	2,80	7,44	2,10	1,70	3,75
6	4,65	3,41	7,12	0,49	2.02	5,36
7,6	4,80	3,71	6,57	0	2,57	5,85

X: Concentración de biomasa (g/l); S = Concentración de lactosa (g/l); Extracto seco (g/l). Medio A: (g/l): Lactosa 6,0; SQMg. 7H₂O 0,2; PO₄HK₂ 1,25; Acido cítrico monohidratado 0,55; Extracto de levadura 2,0; Triptosa 1,5; pH 5,7 - 5,5.

En efecto: $\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{3,34}{5,85} = 0,57$

$$Y = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} = 1 - \frac{2,57}{5,85} = 0,56$$

Una experiencia similar a las anteriores se llevó a cabo utilizando el medio de cultivo B, el cual se sabía de antemano, daba como resultado un rendimiento celular menor que en el medio A, de este modo se podría verificar que la concordancia obtenida en las experiencias anteriores, entre las dos formas de calcular el rendimiento celular, no se debía a un "buen comportamiento del medio de cultivo A. Las condiciones de cultivo fueron similares a las anteriores, salvo que en este caso el volumen de cultivo fue de 3 litros y la agitación de 800 rpm. Los resultados correspondientes están en el cuadro XXIII.

Cuadro XXIII

Valores experimentales de un proceso de desarrollo de K. fragilis

Tiempo (h)	pH	X	S	E
0	5,70	0,27	12,8	26,48
2	5,65	0,41	11,3	26,11
3,5	5,55	0,80	9,3	-
5,0	5,45	1,56	8,3	-
7,0	5,40	3,23	7,0	-
8,5	5,30	4,00	3,6	-
10	5,30	5,14	0,8	19,24
11	5,35	5,15	0,2	19,23

X = Concentración de biomasa (g/l); S = Concentración de lactosa (g/l); E = Extracto seco (g/l); Medio B: (g/l): Lactosa 12,0; Urea 1,2; PO₄H₂K 9,65; ácido cítrico monohidratado 4,25; SO₄Mg. 7H₂O 0,9; Extracto de levadura 2,6; pH 5,7 - 5,5 (La urea se esterilizó por separado a pH 4).

Según los datos del cuadro el rendimiento global es:

$$Y = - \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{4,88}{12,6} = 0,39$$

y en base al extracto seco:

$$Y = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} = 1 - \frac{7,25}{12,6} = 0,42$$

Dado el alto contenido de cítrico de este medio se realizó una experiencia paralela en la que se utilizó dicho medio peso sin lactosa, a los efectos de verificar si el cítrico podía ser utilizado como fuente de carbono y energía en estas condiciones; encontrándose que prácticamente no hubo desarrollo celular, lo cual indica que el ácido cítrico no se consume.

Las tres experiencias realizadas están incluídas en el caso 1°; es decir donde I se comporta como inerte. Pero, según lo expuesto, si esta condición no se cumple ambos rendimientos deberán diferir siendo el calculado en base al extracto seco menor que el calculado en la forma clásica (ecuación 11). Esto se verificó utilizando el medio de cultivo A modificado. La fuente de carbono y energía se disminuyó a la mitad (3 g/l) y la de triptosa se duplicó (3 g/l), el resto del medio se mantuvo igual y las condiciones de cultivo también. Los resultados se consignan en el Cuadro XXIV.

Cuadro XXIV

Valores experimentales de un proceso de desarrollo de K. fragilis

Tiempo (h)	pH	X	S	E
0	5,75	0,39	2,7	8,99
1	5,70	0,61	2,6	8,77
2	5,70	-	2,17	8,86
3	5,70	0,77	1,74	8,84
5	5,50	1,95	1,16	8,00
6	5,35	2,79	0	7,84
7	5,35	2,87	0	7,50

X = Concentración biomasa (g/l); S = Concentración de lactosa (g/l);
E = Extracto seco (g/l). Medio modificado: (g/l) Lactosa 3,0;
SO₄Mg.7H₂O 0,2; PO₄HK₂ 1,25; Acido cítrico monohidratado 0,55;
Extracto de levadura 2,0; Triptosa 3,0.

En este caso resulta:

$$\frac{-\Delta X}{\Delta S} = 0,92$$

$$1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} = 1 - \frac{1.49}{2.7} = 0,45$$

En este caso particular resulta obvio que parte de la biomasa formada lo ha sido a expensas de la fuente de nitrógeno, de otra forma es muy poco probable obtener un rendimiento cercano a 1 con hidratos de carbono como fuente de carbono y energía. El hecho de que el rendimiento calculado en base al extracto seco sea menor podría explicarse, independientemente de la validez de la ecuación (11), en base a que al utilizarse la fuente de nitrógeno como fuente de energía hay una disminución extra del extracto seco, con lo cual el valor de E aumenta en valor absoluto y ésta trae como consecuencia que, para un S dado, la relación $1 - \frac{\Delta E}{\Delta S}$ sea menor.

Finalmente se realizó una experiencia utilizando el medio de cultivo B, pero en este caso con el objeto de estudiar si la relación $-\frac{\Delta E}{\Delta M^{O_2}}$ determinada experimentalmente se correspondía con la teoría, la⁰² cual para la lactosa es de 0,89.

En esta oportunidad el volumen de cultivo fue de 3 litros, con el objeto de tener un mayor consumo de O_2 y cometer menos errores en la determinación. El inóculo provino de 3 erlenmeyers (x 1000) con 100 ml de medio B c/u incubados a 30°C, 15 horas en agitador rotatorio. La aireación fue de 75 l/h y la agitación de 750 rpm. Con el propósito de no modificar el volumen de cultivo, y por ende el consumo de O_2 , sólo se tomaron muestra inicial y final para peso seco, extracto seco y lactosa, siguiéndose el crecimiento celular por medida de absorbancia a 625 nm las cuales reaquieren escasos ml de muestra. Esporádicamente se determinó la producción de CO_2 encontrándose que el cociente respiratorio $\frac{CO_2}{O_2}$ se mantuvo cercano a 1 durante todo el cultivo, lo cual indica que éste tuvo una aireación suficiente.

En la figura 9 se observa el consumo de O_2 ml/l.h (en condiciones normales) y la curva de crecimiento celular. El área bajo la curva de consumo de O_2 representa el total de O_2 consumido en ml/l.

En el cuadro XXV se dan las condiciones inicial y final del cultivo que corresponden a promedios de duplicados.

Cuadro XXV				
Valores iniciales y finales para un cultivo de K. fragilis en tanque agitado				
	X (g/l)	S(g/l)	E(g/l)	MO ₂ (g/l)
Inicial	0,60	11,7	26,7	0
Final	5,38	0	21,2	4,97

X = Concentración de biomasa (g/l); S = Concentración de lactosa (g/l)
 E = Extracto seco (g/l); MO₂ = O₂ consumido (g/l).

En base a los datos de la tabla se obtiene:

$$\begin{aligned}
 Y &= - \frac{\Delta X}{\Delta S} = 0,41 \\
 Y &= 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} = 0,52 \\
 - \frac{\Delta E}{\Delta M_{O_2}} &= 1,10
 \end{aligned}$$

Si se considera que la relación teórica $-\frac{\Delta E}{\Delta M_{O_2}}$ es de aproximadamente 0,9, el grado de concordancia con el valor experimental es bastante aceptable. Por otra parte, en esta ocasión ambos rendimientos no coinciden tan estrechamente como en casos anteriores. Se encuentra que el Y calculado en base al E es mayor que el calculado en la forma clásica por lo que puede ser probable que se haya formado algún producto no volátil, puesto que según la ecuación (10) en este caso se tiene que:

$$Y + Y_p = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S}$$

Lo cual justificaría el mayor valor de Y obtenido, con respecto al calculado como $\frac{\Delta X}{\Delta S}$ puesto que resultaría ser la suma del rendimiento en biomasa y el rendimiento de producto no volátil

En base a los resultados obtenidos, se puede estimar ahora el rendimiento celular resultante del cultivo realizado a escala industrial con suero de queso suplementado. Tal como se estableció

en esa ocasión el medio de cultivo tenía sólidos en suspensión provenientes del macerado de maíz y de la fracción del suero coagulable por calor. En el cuadro XXVI se consignan los valores iniciales y finales de extracto seco, lactosa y recuento celular.

Cuadro XXVI

Valores experimentales del proceso de obtención de *K. fragilis* en escala industrial
(Valores correspondientes a la fig. 5)

	S (g/l)	E (g/l)	cel/ml
Inicial	45	60,0	$0,22 \cdot 10^8$
Final	0,8	31,1	$14 \cdot 10^8$

S = Concentración de lactosa (g/l); E = Extracto seco (g/l)

En base a los datos de la tabla el rendimiento será: $Y = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} = 0,34$
Por otra parte el rendimiento calculado en base a la correlación peso seco vs. recuento (ver materiales y métodos) arroja un valor de 0,38.

Si bien no se ha ensayado experimentalmente el caso 2º) (formación de producto no volátil) ya que no hacía al objetivo de este trabajo, resulta de interés comentar este caso particular puesto que el mismo impone restricciones al uso de este método para estimar el rendimiento celular.

La ecuación (10) establece que cuando se forma un producto no volátil, la relación $1 - \frac{dE}{dS}$ no es igual a Y sino a $Y + Y_p$, con lo cual, por este método, se estaría sobre estimando el rendimiento celular.

Normalmente las cepas utilizadas para producir biomasa son "buenas productoras" de la misma en el sentido de que la fuente de carbono y energía es realmente utilizada como tal, y una mínima parte se desperdicia bajo la forma de subproductos metabólicos, por lo que en estos casos Y_p será pequeño y por lo tanto $Y + Y_p \approx Y$.

Como contrapartida el método sería útil para detectar cepas

que formen algún producto no volátil con un Y_p razonable en un medio que no contenga sólidos en suspensión, ya que bastará con comparar el rendimiento calculado como $Y = \frac{-\Delta X}{\Delta S}$ con $Y = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S}$.

Si se cumple que $1 - \frac{\Delta E}{\Delta S} > - \frac{\Delta X}{\Delta S}$, tal discrepancia sugerirá que se han formado uno o más productos; todo esto suponiendo que la fuente de nitrógeno no puede ser utilizada como fuente de energía (caso 3) pues en tal circunstancia el método no discierne.

En el caso de que se forme un producto volátil (ej. etanol), la ecuación (6) se sigue cumpliendo puesto que el mismo al igual que el H_2O o el CO_2 no contribuyen al extracto seco.

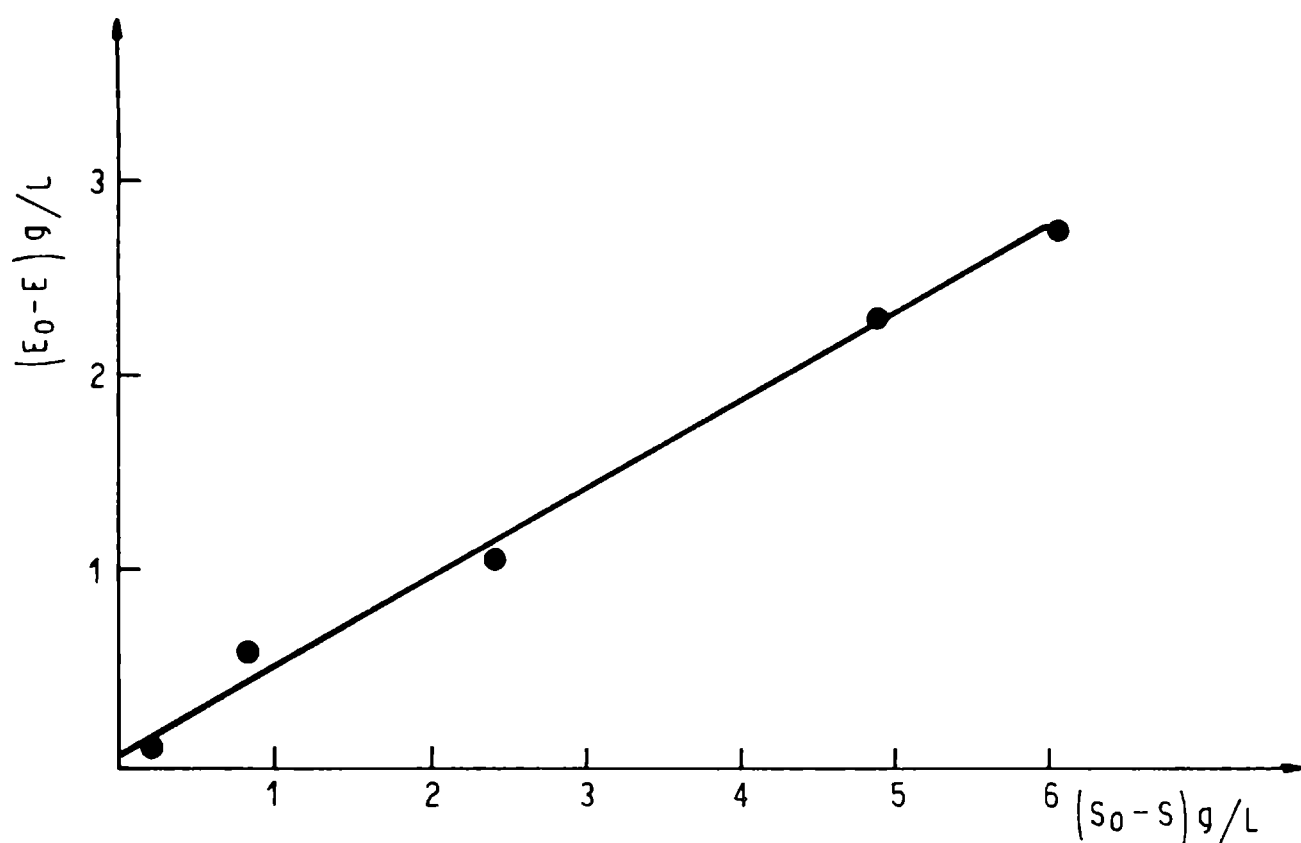


Figura 8: Correlación entre el extracto seco y la fuente hidrocarbonada en un cultivo en tanque agitado de *K. fragilis*. Medio A (g/l): Lactosa 6,0; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; PO_4HK_2 1,25; Acido cítrico monohidratado 0,55; Extracto de levadura 2,0; Triptosa 1,5; pH= 5,7-5,5. Aeración 1 l/min; agitación 400 RPM, volumen de cultivo 1,6 l.

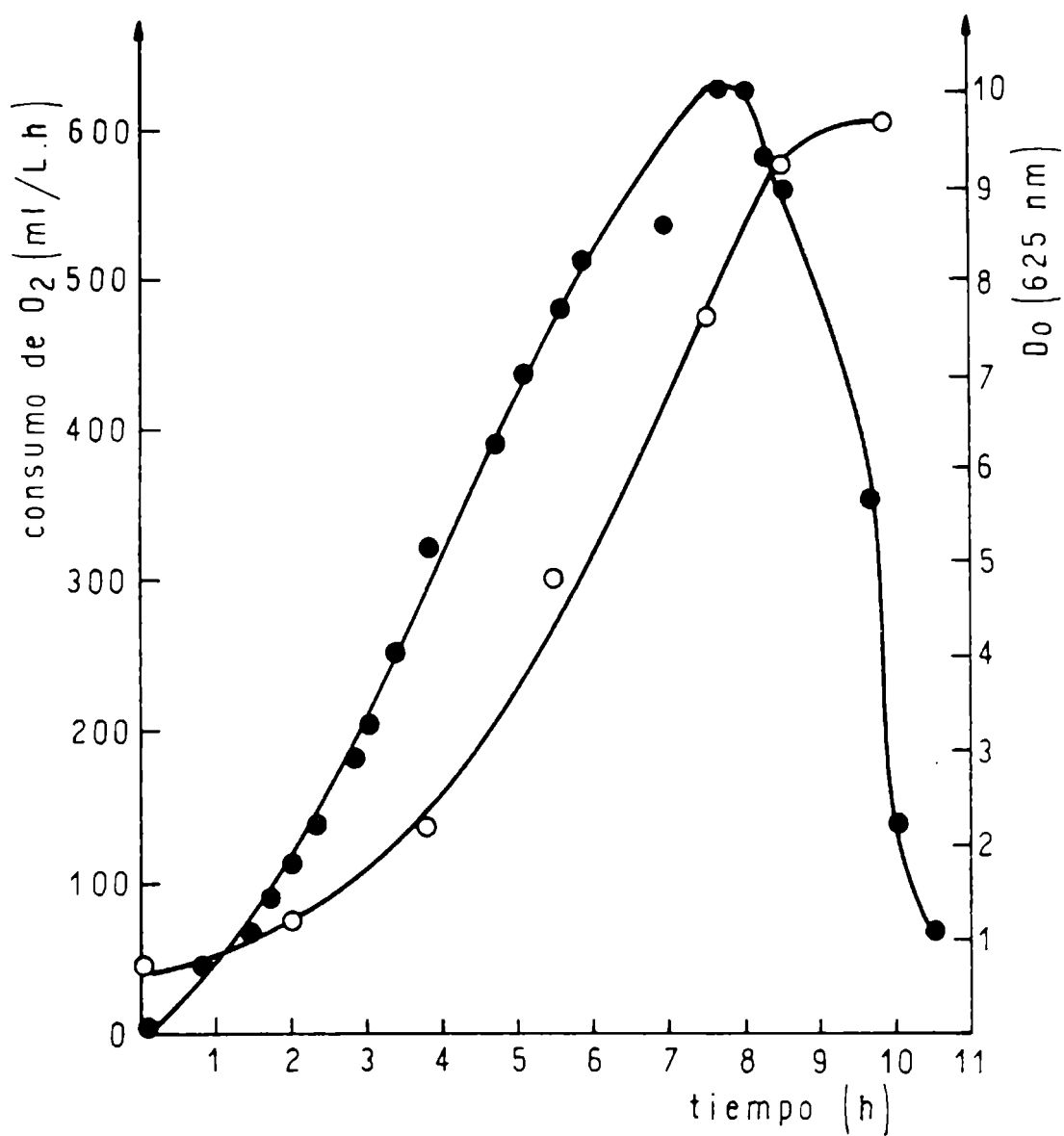


Figura 9: Crecimiento celular (O) y consumo de O_2 (●) de un cultivo de *K. fragilis* en tanque agitado. Medio de cultivo B (g/l): Lactosa 12,0; urea 1,2; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 9,65; Acido cítrico monohidratado 4,25; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,9. Extracto de levadura 2,6; pH = 5,5-5,7.

CULTIVO DISCONTINUO ALIMENTADO: Modelo matemático

Tal como se reseñó en la introducción, el cultivo discontinuo alimentado (CDA) es un caso intermedio entre el batch clásico y el cultivo continuo.

Se asemeja a un cultivo en batch en el sentido de que las células se cosechan al final de la operación y a un cultivo continuo porque constantemente ingresa al sistema medio de cultivo fresco. El ingreso de nutrientes a un CDA conduce a un aumento del volumen del cultivo en función del tiempo, lo cual también lo diferencia del Batch y del continuo.

La práctica del CDA data del año 1919, cuando comenzó a utilizarse en la producción de levaduras para panificación. De este modo se obtenía un producto más estable y se mejoraba considerablemente el rendimiento celular⁽⁵⁶⁾. Actualmente, al menos en nuestro País, se sigue utilizando este tipo de cultivo, principalmente en la producción de levaduras para panificación aunque el agregado de medio fresco no es continuo sino que se realiza en forma discontinua, dependiendo la cantidad a agregar de un cronograma previamente establecido en base a la experiencia. En cualquier caso lo que se procura es mantener la concentración de nutrientes a un nivel tal que no resulte limitante para el microorganismo pero no tan elevada que haya un efecto de inhibición por alguno de los nutrientes⁽⁵⁷⁾. A modo de ejemplo, en el caso de las levaduras, puede citarse el efecto Crabtree (también conocido como reversa del efecto Pasteur, por el cual

una concentración relativamente alta de glucosa provoca una inhibición de la respiración celular.

El CDA también puede mostrarse útil para cultivar microorganismos sensibles a la presión osmótica⁽⁸²⁾, ya que en este caso la concentración de nutrientes en el medio de cultivo nunca es demasiado elevada, porque a medida que los mismos ingresan son consumidos por los microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, el CDA es de antigua data dentro del campo de la Biotecnología, principalmente debido a su gran interés desde el punto de vista industrial. Tal interés hizo que el CDA se realizase en forma empírica en base a una rutina preestablecida de adición de medio de cultivo.

Resulta claro que este método de optimización de un CDA además de insumir tiempo puede llegar a ser muy costoso cuando de escalas industrial o planta piloto se trata. Esto en modo alguno significa que el hecho de contar con un modelo matemático el problema quede resuelto, sino que se simplifica, ya que da una base para realizar las experiencias o las modificaciones necesarias para ajustar el sistema.

Durante bastante tiempo, desde la aparición del trabajo de Monod sobre cultivo continuo⁽⁷¹⁾, una buena parte de la literatura referente a Biotecnología estuvo dedicada a la presentación de modelos sobre cultivo continuo. Recién en estos últimos años han comenzado a aparecer más frecuentemente trabajos sobre cultivos discontinuos con alimentación, en sus distintas variantes. Los más frecuentes son aquellos en que tanto caudal como concentración de nutrientes en la alimentación son constantes^(72,73), y el agregado se realiza en forma ininterrumpida. En otros el agregado es tal que se mantiene constante la concentración de sustrato limitante en el cultivo o se realizan agregados según una política preestablecida, mediante una computadora conectada al sistema^(74,75). Estos requieren el uso de equipos altamente automatizados.

Entre los modelos propuestos se consideran distintas posibilidades de conducir un CDA, así por ejemplo puede mantenerse constante la concentración de sustrato limitante en la alimentación mientras que el caudal de alimentación puede ser lineal o exponencial, incluyendo el caso de CDA repetido, (esto es: una vez que se ha alcanzado el volumen final, se cosecha un

volumen de cultivo tal que nuevamente quede el volumen que inicialmente se tenía, y se comienza un nuevo CDA) y estableciendo las condiciones para las cuales se obtiene la máxima productividad⁽⁷⁶⁾.

El modelo CDA que aquí se propone trata de fijar criterios tales que permitan acoplar la demanda de nutrientes por parte de los microorganismos con el suministro a través de la alimentación.

La utilización de este modelo además de su posibilidad de aplicación a la obtención de proteínas unicelulares presenta un carácter general y constituye una contribución al desarrollo de la tecnología de los procesos fermentativos por lo que las experiencias efectuadas están diseñadas con el único objeto de comprobar su validez (o comportamiento).

Tipos de alimentación:

Existen diversas maneras de alimentar un CDA, según el caudal de alimentación y la concentración de sustrato limitante en la alimentación, varíen con el tiempo o no. Para ejemplificar sean:

F = caudal de alimentación

S_R = concentración de sustrato limitante en la alimentación

Puede ocurrir que:

- 1) F y S_R sean constantes.
- 2) $F = F(\theta)$ (variable en el tiempo); S_R constante
- 3) $S_R = S_R(\theta)$ (variable en el tiempo); F constante
- 4) $F = F(\theta)$ y $S_R = S_R(\theta)$

Cada tipo de fermentación origina dentro del fermentador un "Perfil de concentración" el cual puede definirse como la variación de la concentración de sustrato limitante dentro del fermentador en ausencia de microorganismo.

En la figura 10 puede observarse un esquema de un CDA juntamente con algunos perfiles de concentración.

- A) $S = S_0 = \text{constante}$
- B) $S = S_0 + k \theta$ (lineal)
- C) $S = S_0 + k \theta^2$ (cuadrático)

Donde S_0 = concentración de sustrato en el fermentador en el instante de comenzar la alimentación.

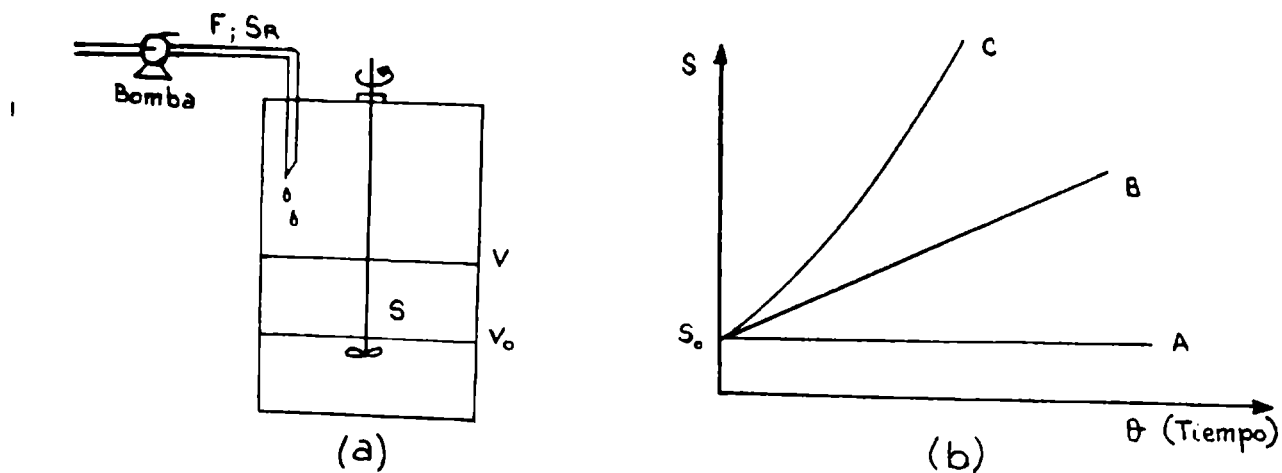


Fig. 10. a) Variación de volumen desde V_0 (inicial) hasta V , en el fermentador, debido al ingreso de nutrientes.- b) Distintos perfiles de concentración que pueden ser obtenidos modificando la alimentación ($F; S_R$).

S = Concentración de sustrato limitante en el fermentador durante la alimentación.

Obviamente son posibles infinitos tipos de perfiles. De los que se ejemplificaron, el A es el más fácil de obtener, basta con hacer $S_R = S_0$, mientras que para obtener el perfil B (lineal) es necesario, para F constante, que $S_R(\theta)$ sea lineal aunque, como se mostrará más adelante, esta sola condición no baste.

En el presente desarrollo se detallará el caso de un CDA con caudal de alimentación constante y concentración de sustrato limitante linealmente variable en el tiempo, de manera que en ausencia de microorganismos origine un perfil de concentración lineal.

En primer lugar se estudia cómo obtener un perfil lineal y luego, cómo acoplar la alimentación de sustrato con la demanda de dicho sustrato por parte de los microorganismos.

Obtención de un perfil de concentración lineal

Condiciones:

$$F = \frac{dV}{d\theta} = \text{constante} \quad (1)$$

$$S_R = S_R(\theta) \quad (2)$$

Nota: el subíndice "0" indica el valor instantáneo de cualquier variable al comenzar la alimentación.

Si deseamos que:

$$S = S_0 + k\theta \quad (3)$$

se debe establecer cómo debe ser $S_R(\theta)$ para que la ec. (3) se cumpla.

Balance de materia:

Velocidad de acumulación de sustrato	=	Velocidad de suministro de sustrato
--	---	---

$$\frac{d(S.V)}{d\theta} = F.S_R(\theta) \quad (4)$$

El primer miembro de la ec. (4) es la derivada de un producto

$$V \cdot \frac{dS}{d\theta} + S \cdot \frac{dV}{d\theta} = F S_R(\theta) \quad (5)$$

Además de la ecuación (1) surge:

$$\frac{dV}{d\theta} = F; \text{ luego } V = V_o + F \theta \quad (6)$$

donde V_o = volumen inicial en el fermentador (fig. 10)

Por la ecuación (3) se tiene: $S = S_o + k\theta$; luego

$$\frac{dS}{d\theta} = k \quad (7)$$

Introduciendo las ecuaciones (1); (6); (3) y (7) en la ecuación (5) resulta:

$$(V_o + F\theta) k + (S_o + k\theta) F = F S_R(\theta)$$

Por lo tanto:

$$S_R(\theta) = S_o + B + 2 k\theta \quad (8)$$

$$\text{Donde } B = \frac{V_o k}{F} \quad (9)$$

La ecuación (8) muestra que para obtener un perfil lineal con las condiciones fijadas es necesario que $S_R(\theta)$ también sea lineal. Sin embargo cabe aquí la siguiente consideración: un $S_R(\theta)$ lineal no garantiza, por sí, un perfil lineal. En efecto, supongamos una alimentación lineal con $F = \text{constante}$.

$$S_R(\theta) = A + C\theta \quad (10)$$

con A y C constantes cualesquiera.

Por balance de materia se tendrá:

$$\frac{d(SV)}{d\theta} = F (A + C\theta) \quad (11)$$

Resolviendo la derivada del primer miembro de la ecuación (11) queda:

$$V \cdot \frac{dS}{d\theta} + S \cdot \frac{dV}{d\theta} = F (A + C\theta) \quad (12)$$

Nuevamente reemplazamos: $V = V_0 + F\theta$ y $\frac{dV}{d\theta} = F$

con lo que resulta

$$(V_0 + F\theta) \frac{dS}{d\theta} + S F = F (A + C\theta) \quad (13)$$

Resolviendo esta ecuación diferencial con la condición inicial: $S = S_0$ cuando $\theta = 0$ se obtiene el perfil de concentración.

$$S = \frac{1}{2} \frac{F(C\theta^2 + 2A\theta) + S_0 V_0}{V_0 + F\theta} \quad (14)$$

el cual dista mucho de ser lineal. Ahora bien, si se hace:

$C = 2 K$; y; $A = \frac{V_0 k}{F} + S_0$, la ecuación (10) se transforma en la (8) y, consecuentemente, la ecuación (14) se transforma en la (3) es decir: $S = S_0 + K\theta$.

Por lo tanto, no cualquier alimentación lineal genera un perfil lineal. Una forma más simple de ver esto es pensar en la obtención de un perfil constante como el A de la figura 10. En tal caso resulta obvio que deberá ser $S_R = S_0$ (basta con hacer $k = 0$ en la ecuación (8)) ya que si por ejemplo, S_R es mayor que S_0 , el perfil de concentración, S , variará en el tiempo y tenderá asintóticamente al valor de S_R .

En la práctica, una alimentación lineal se consigue mediante un dispositivo como el que se ilustra en la figura 11. El mismo, frecuentemente utilizado en técnicas cromatográficas, consiste en dos reservorios que funcionan a modo de vasos comunicantes, el primero contiene medio de cultivo más concentrado que el segundo, el cual a su vez está agitado y conectado a una bomba que envía el medio de cultivo al fermentador⁽⁷⁷⁾.

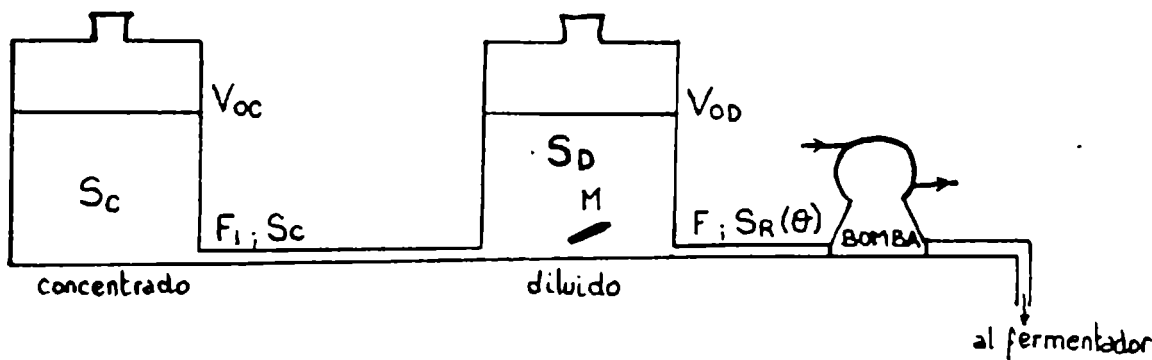


Fig. 11. Dispositivo para obtener una alimentación lineal (ver el significado de las letras en el texto)

A medida que la bomba aspira medio del reservorio diluído ingresa medio concentrado y en consecuencia la concentración en el reservorio diluído aumenta en función del tiempo.

En la deducción que sigue se supone que no existe difusión entre los reservorios y que éstos son idénticos en cuanto a diámetro interno. Asimismo se supone que la densidad de ambas soluciones es comparable.

S_C = Concentración de sustrato en el reservorio concentrado = cte.

$S_D = S_R(\theta)$ = Concentración de sustrato en el reservorio diluído

V_C = Volumen de medio en el reservorio concentrado

V_D = Volumen de medio en el reservorio diluído.

La variación de volumen en el reservorio concentrado está dada por:

$$-\frac{dV_C}{d\theta} = F_1 \quad (15)$$

En el reservorio diluído ingresa F_1 y sale F , luego la variación de volumen será

$$\frac{dV_D}{d\theta} = F_1 - F \quad (16)$$

Además en todo momento se cumple que:

$V_C = V_D$ por lo que $\frac{dV_C}{d\theta} = \frac{dV_D}{d\theta}$; en base a esto, de las ecuaciones (15) y (16) surge que: $F_1 = 1/2 F$ (17).

Introduciendo la ecuación (17) en la (16) e integrando entre 0 y θ se obtiene la variación de volumen V_D en función del tiempo:

$$V_D = V_{oD} - \frac{F}{2} \theta \quad (18)$$

Donde V_{oD} es el volumen inicial en el reservorio diluído que, por supuesto, es igual al del concentrado.

Para obtener la variación de concentración de sustrato en el reservorio diluído ($S_R(\theta)$) se debe efectuar un balance de materia en dicho reservorio.

Acumulación = ingreso - salida

$$\frac{d(S_R(\theta) \cdot V_D)}{d\theta} = F_1 S_C - F S_R(\theta) \quad (19)$$

Resolviendo la derivada del primer miembro de la ecuación (19) queda:

$$V_D \frac{dS_R(\theta)}{d\theta} + S_R(\theta) \frac{dV_D}{d\theta} = F_1 S_C - F S_R(\theta) \quad (20)$$

Reordenando la ecuación (20) e introduciendo las ecuaciones (16), (17), (18):

$$\frac{d S_R(\theta)}{d\theta} + \frac{F S_R(\theta)}{2(V_{oD} - \frac{F}{2} \theta)} = \frac{F S_C}{2(V_{oD} - \frac{F}{2} \theta)}$$

La cual corresponde a una ecuación diferencial lineal de primer orden, cuya solución con la condición inicial $S_R(\theta) = S_{D^o}$ cuando $\theta = 0$ es:

$$S_R(\theta) = S_{D^o} + \frac{F}{2V_{oD}} (S_C - S_{D^o}) \theta \quad (22)$$

La ecuación (22) muestra claramente que con un dispositivo como el de la figura se logra que la concentración de sustrato que ingresa al fermentador aumente linealmente en el tiempo. Si ahora se impone la condición de que esta alimentación genere a su vez un perfil de concentración lineal deberá igualarse miembro a miembro la ecuación (22) con la ecuación (8), de donde resulta que:

$$S_{D^o} = S_o + B \quad (23)$$

$$\frac{F}{2 V_{oD}} (S_C - S_{D^o}) = 2 k \quad (24)$$

Por lo tanto si se conocen k , F , V_o y V_{oD} se pueden calcular S_C y S_{D^o} tales que originen el perfil deseado.

Diseño de un CDA

Corresponde ahora incluir a los microorganismos en el balance de materia considerando que éstos consumen una cierta fracción del sustrato que ingresa al fermentador de acuerdo a las condiciones que se impongan.

Postulados:

$$1. \quad \frac{d(xv)}{d\theta} = uxv \quad (25)$$

$$2. \quad Y = - \frac{dx}{ds} = - \frac{d(xv)}{d(sv)} \quad (26)$$

3. La densidad del cultivo en el fermentador y la del medio de cultivo en los reservorios es semejante.

Balance de materia para el sustrato:

Acumulación = Ingreso - consumo

$$\frac{d(sv)}{d\theta} = F S_R(\theta) - \text{consumo} \quad (27)$$

La velocidad de consumo puede expresarse mediante la ecuación (26) sin considerar el signo negativo porque éste ya fue incluido en el balance.

$$\frac{d(sv)}{d\theta} = F S_R(\theta) - \frac{1}{y} \frac{d(xy)}{d\theta} \quad (28)$$

Si imponemos ahora la condición de estado estacionario $\frac{d(sv)}{d\theta} = 0$

$$\frac{d(xy)}{d\theta} = yF S_R(\theta) \quad (29)$$

Debe destacarse que se eligió la condición $\frac{d(sv)}{d\theta} = 0$ sólo por razones de simplicidad; igualmente podría haberse impuesto la condición $\frac{ds}{d\theta} = 0$ o alguna otra, al menos teóricamente.

Si se reemplaza en la ecuación (29) el valor de $S_R(\theta)$ previamente hallado (ec. (8)) y se integra entre 0 y θ

$$\int_{x_0 v_0}^{xv} d(xy) = yF \int_0^{\theta} (S_0 + B + 2k\theta) d\theta$$

$$\text{Se obtiene: } xv = x_0 v_0 + yF \left[(S_0 + B) \theta + k \theta^2 \right] \quad (30)$$

Esta ecuación resulta interesante porque muestra que la cantidad total de biomasa (xv) no aumenta exponencialmente, como lo haría en un batch, sino según una función cuadrática, es decir que de algún modo los microorganismos responden al tipo de alimentación que se les está suministrando. La ecuación (30) se puede expresar totalmente en función de θ si se reemplaza a v por $v_0 + F\theta$ (ec. (6)) y despejando x .

$$x = \frac{x_0 v_0 + yF \left[(S_0 + B) \theta + k \theta^2 \right]}{v_0 + F\theta} \quad (31)$$

Por otra parte de la condición de estado estacionario surge el valor de la concentración de sustrato durante el CDA.

$$\frac{d(Sv)}{d\theta} = 0 \longrightarrow Sv = S_0 v_0 \quad (32)$$

$$\text{o bien: } S = \frac{S_0 v_0}{v_0 + F\theta} \quad (33)$$

Esta condición de estado estacionario, o bien la ecuación (32), está indicando que todo el sustrato que ingresa al fermentador es consumido por los microorganismos ya que la cantidad total de sustrato inicial ($S_o v_o$) permanece constante; o de otro modo; la concentración de sustrato disminuye conforme a la ecuación (33) debido al efecto de dilución que causa el ingreso de medio de cultivo al fermentador.

Las ecuaciones (31) y (33) predicen el valor instantáneo de la concentración de biomasa y de sustrato limitante durante el CDA. Corresponde ahora acoplar la demanda de sustrato con el suministro.

Del balance de materia surgía que (ec. (29))

$$\frac{d(xv)}{d\theta} = y F S_R(\theta) \quad (29)$$

Si se reemplaza $S_R(\theta)$ por la ecuación (8)

$$\frac{d(xv)}{d\theta} = y F (S_o + B + 2k \theta).$$

Esta ecuación también se debe cumplir a tiempo cero, es decir:

$$\left. \frac{d(xv)}{d\theta} \right|_{\theta = 0} = y F (S_o + B) \quad (34)$$

Por la ecuación (25) se tiene

$$\left. \frac{d(xv)}{d\theta} \right|_{\theta = 0} = u_o x_o v_o \quad (35)$$

Introduciendo la ecuación (35) en la ecuación (34) y recordando que $B = \frac{v_o k}{F}$

$$u_o x_o v_o = y F + (S_o + \frac{v_o k}{F}) \quad (35)$$

De donde resulta que:

$$k = \frac{u_o x_o}{y} - \frac{F S_o}{v_o} \quad (36)$$

Finalmente la ecuación (36) relaciona parámetros ligados a la alimentación de sustrato (k, F) con los inherentes al microor-

ganismo (u_o , y) y a las condiciones del batch en el instante de comenzar el CDA (x_o , v_o , S_o). Todo par de valores (k , F) que satisfagan la ecuación (36) dará lugar, al menos en teoría, a una pendiente inicial de crecimiento igual a $u_o \cdot x_o \cdot v_o$.

En base a estas correlaciones el diseño del CDA resulta muy simple:

1. Mediante la ecuación (36) se calcula un par de valores k , F .
2. A partir de dichos valores (k y F) y mediante las ecuaciones (23) y (24) se determinan S_{D_o} y S_c para un valor de V_o dado.

Otra forma de encarar el diseño es la siguiente:

DATOS: Conocidos los valores x_o , v_o , S_o , u_o , y , x_f , v_f ; de los cuales los cinco primeros caracterizan al batch en el momento de comenzar el CDA y los dos últimos se fijan a voluntad según las posibilidades del fermentador en el que se realiza el cultivo; es decir que el volumen final, v_f , se elegirá de acuerdo a las dimensiones del fermentador (volumen útil) y x_f (concentración final de biomasa) de acuerdo a la capacidad de transferencia de O_2 del equipo (suponiendo un cultivo aerobio) o alguna otra restricción.

INCOGNITAS: k , F , θ_f . Donde θ_f representa el tiempo que durará el CDA medido desde el instante en que se comenzó el agregado de nutrientes.

Para calcular las tres incógnitas se requieren tres ecuaciones independientes.

$$I. \quad xv = x_o v_o + yF \left[(S_o + B) \theta + k \theta^2 \right] \quad ; \text{ con } B = \frac{v_o k}{F}$$

$$II. \quad k = \frac{u_o \cdot x_o}{y} - \frac{F \cdot S_o}{v_o}$$

$$III. \quad v = v_o + F\theta$$

La (I) se puede expresar como:

$$x_f v_f = x_o v_o + yF \theta_f (S_o + B + k\theta_f)$$

de donde:

$$S_o + \frac{v_o k}{F} + k\theta_f = \frac{x_f v_f - x_o v_o}{y F \theta_f} \quad (IV)$$

$$\text{Por (III): } F\theta_f = v_f - v_o = \Delta v \quad (V)$$

Reemplazando $F\theta_f$ en la ecuación (IV)

$$S_o + \frac{v_o k}{F} + k\theta_f = \frac{x_f v_f - x_o v_o}{y \Delta v} = \frac{\Delta x v}{y \Delta v} = G$$

Por tanto: $k\theta_f = G - S_o - \frac{v_o k}{F}$ (VI)

Multiplicando y dividiendo el tercer miembro de la izquierda por θ_f resulta:

$$k\theta_f = G - S_o - \frac{v_o k}{F} \frac{\theta_f}{\theta_f}$$

Pero por III: $F\theta_f = \Delta v$; luego:

$$k\theta_f = G - S_o - \frac{v_o k}{\Delta v} \theta_f$$

De donde se puede despejar $k\theta_f$:

$$k\theta_f = \frac{G - S_o}{1 + \frac{v_o}{\Delta v}} \quad (VII)$$

Multiplicando la (II) por θ_f y despejando θ_f

$$\theta_f = (k\theta_f + \frac{F\theta_f S_o}{v_o}) \frac{y}{u_o x_o}$$

Puesto que se conocen $F\theta_f$ (ecuación (V)) y $k\theta_f$ (ecuación (VII)) se puede calcular θ_f y con éste k y F . Conocidos k y F se diseña la alimentación necesaria mediante las ecuaciones (23) y (24), teniendo en cuenta que $v_{oD} = 1/2 (v_f - v_d)$.

Determinación del rendimiento celular:

Para determinar el rendimiento celular durante un CDA se debe tener en cuenta que constantemente ingresa al fermentador medio de cultivo.

Según el balance de materia, ecuación (28):

$$\frac{d(sv)}{d\theta} = F S_R(\theta) - \frac{1}{y} \frac{d(xv)}{d\theta} \quad (28)$$

Integrando entre 0 y θ_f y despejando y obtenemos:

$$y = \frac{x_f v_f - x_o v_o}{S_o v_o - S_f v_f + F \int_0^{\theta_f} S_R(\theta) d\theta} \quad (37)$$

Si la condición de estado estacionario se cumplió durante el CDA, es evidente que $S_f v_f = S_o v_o$; con lo cual la ecuación (37) se reduce a:

$$y = \frac{x_f v_f - x_o v_o}{F \int_0^{\theta_f} S_R(\theta) d\theta} \quad (38)$$

En caso contrario, para los fines del cálculo, debe ser considerada la diferencia. En cualquier caso la cantidad total de sustrato adicionado está dada por:

$$F \int_0^{\theta_f} S_R(\theta) d\theta$$

Si fueron adicionados la totalidad de los volúmenes de los reservorios, puesto que se conoce la concentración y el volumen inicial de los mismos, no hay problema en calcular el rendimiento. Si los reservorios no fueron consumidos en su totalidad, se debe medir (o calcular en base a F) el volumen y la concentración (del diluído, ya que la del concentrado es constante) y en base a esto realizar los cálculos pertinentes.

NOMENCLATURA

θ = Tiempo

x = Concentración de biomasa (p/v)

S = Concentración de sustrato en el fermentador (p/v)

$S_R(\theta)$ = Concentración de sustrato en la alimentación (p/v)

u = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

v = Volumen dentro del fermentador (l)

y = Rendimiento celular

v_D = Volumen en el reservorio diluído (l)

S_c = Concentración de sustrato en el reservorio concentrado (p/v)

$S_D = S_R(\theta)$ Concentración de sustrato en el reservorio diluído (p/v)

Subíndice 0 = Indica el valor de cualquier variable al comenzar la alimentación.

Subíndice f = Indica el valor de cualquier variable al finalizar la alimentación.

F = Caudal de alimentación (v/t)

$k = \text{Constante} \left(\frac{p}{v \cdot t} \right)$

, B, C, G = Constantes.

EXPERIENCIAS DE CULTIVOS DISCONTINUOS ALIMENTADOS

Resultados y Discusión

Validez de las ecuaciones propuestas

Se realizaron ensayos con el fin de comprobar la validez de las ecuaciones propuestas en lo referente a la variación de la concentración de sustrato limitante en el caudal de alimentación y en el fermentador. A tal fin se utilizó, por simplicidad, el colorante rojo congo como "sustrato limitante" cuya concentración puede ser directamente evaluada por determinación de la absorbancia. En este caso se utilizó una longitud de onda de 544 nm. y se estableció que para medidas de absorbancia menores que 0,71 la solución acuosa del colorante cumple con la Ley de Lambert - Beer. No se ensayaron concentraciones mayores, por lo que toda muestra con mayor concentración fue convenientemente diluída de manera que su valor de absorbancia se encontrase dentro del rango establecido.

Como reservorios se utilizaron dos recipientes de un litro de capacidad con salida lateral en la base. El reservorio diluído fue agitado mediante un agitador magnético. Los frascos se conectaron al fermentador mediante una bomba peristáltica de caudal regulable. En todos los casos se tomaron muestras simultáneas a intervalos regulares del reservorio diluído y del fermentador con el objeto de determinar experimentalmente $S_R(\theta)$ y el perfil de concentración S respectivamente.

1) Se diseñó una alimentación con las siguientes condiciones:

$$S_o = 0 \text{ UDO (unidades de densidad óptica)}$$

$$v_o = 0,75 \text{ l}$$

$$v_o = 0,5 \text{ l}$$

$$k = 0,22 \frac{\text{UDO}}{\text{h}}$$

$$B = \frac{v_o k}{F} = 0,32$$

$$F = 0,34 \frac{\text{l}}{\text{h}}$$

En base a estos datos, mediante las ecuaciones (23) y (24)

$$\text{surge que } S_{D_o} = 0,32 \text{ UDO}$$

$$S_c = 2,26 \text{ UDO}$$

En la fig. 12 se observan las gráficas de $S_R(\theta)$ y S en función del tiempo. En ambos casos los valores experimentales se ajustan muy bien con las respectivas rectas cuyas ecuaciones son.

<u>Experimental</u>	<u>Teórico</u>
(cuadrados mínimos)	
$S_R(\theta) = 0,314 + 0,427 \theta$	$S_R = 0,32 + 0,44 \theta$
$S = 0,202 \theta - 0,008$	$S = 0,22 \theta$

II) Se diseñó otra alimentación modificando las condiciones anteriores. En este caso:

$$S_o = 0,05 \text{ UDO}$$

$$V^o D = 0,75 \text{ l}$$

$$v_o = 0,5 \text{ l}$$

$$k = 0,077 \frac{\text{UDO}}{h}$$

$$B = 0,31$$

$$F = 0,123 \frac{1}{h}$$

Nuevamente se utilizan las ecuaciones (23) y (24) para calcular la concentración en el reservorio diluido y en el concentrado

$$S_{D^o} = 0,36 \text{ UDO}$$

$$S_c = 2,26 \text{ UDO}$$

En la figura (13) se observan las gráficas de $S_R(\theta)$ y S son similares al caso anterior pero con distintas pendientes.

<u>Experimental</u>	<u>Teórico</u>
(cuadrados mínimos)	
$S_R(\theta) = 0,346 + 0,165 \theta$	$S_R(\theta) = 0,36 + 0,154 \theta$
$S = 0,053 + 0,074 \theta$	$S = 0,050 + 0,077 \theta$

Se debe notar que tanto en la experiencia I como en la II se cumple que la pendiente de la recta $S_R(\theta)$ V_s tiempo es aproximadamente el doble que la correspondiente a S V_s tiempo en cada caso, lo cual se ajusta a lo que establece la teoría.

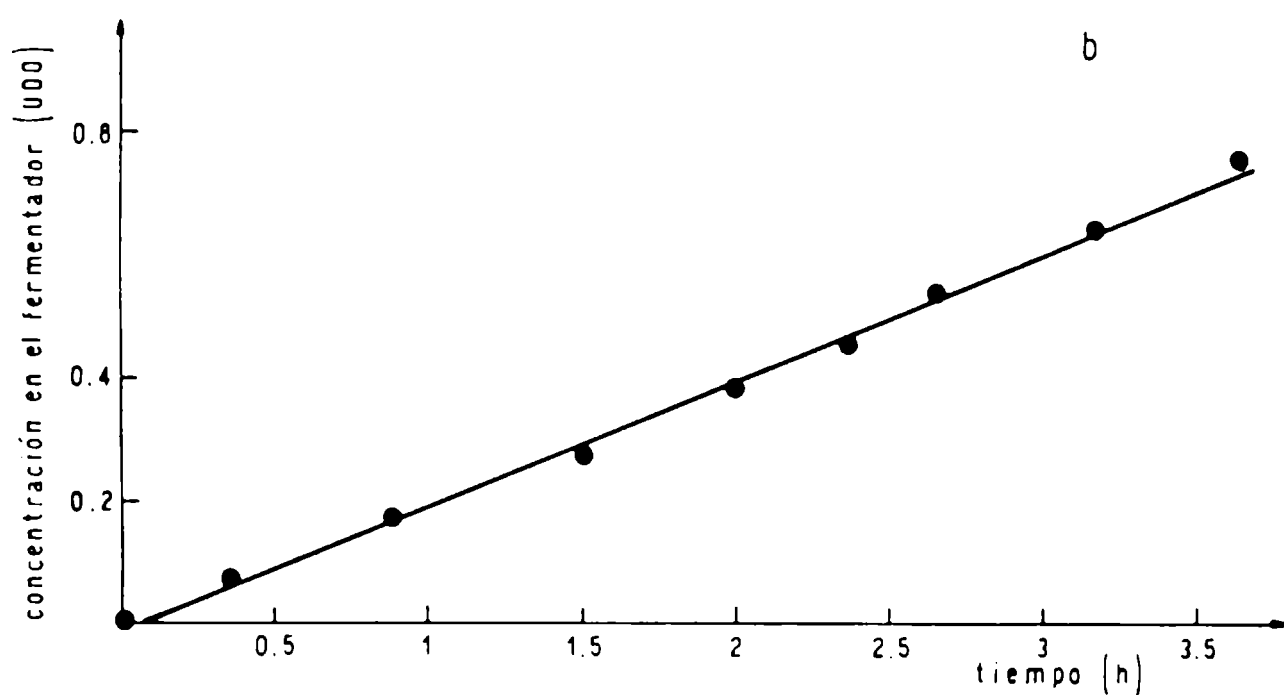
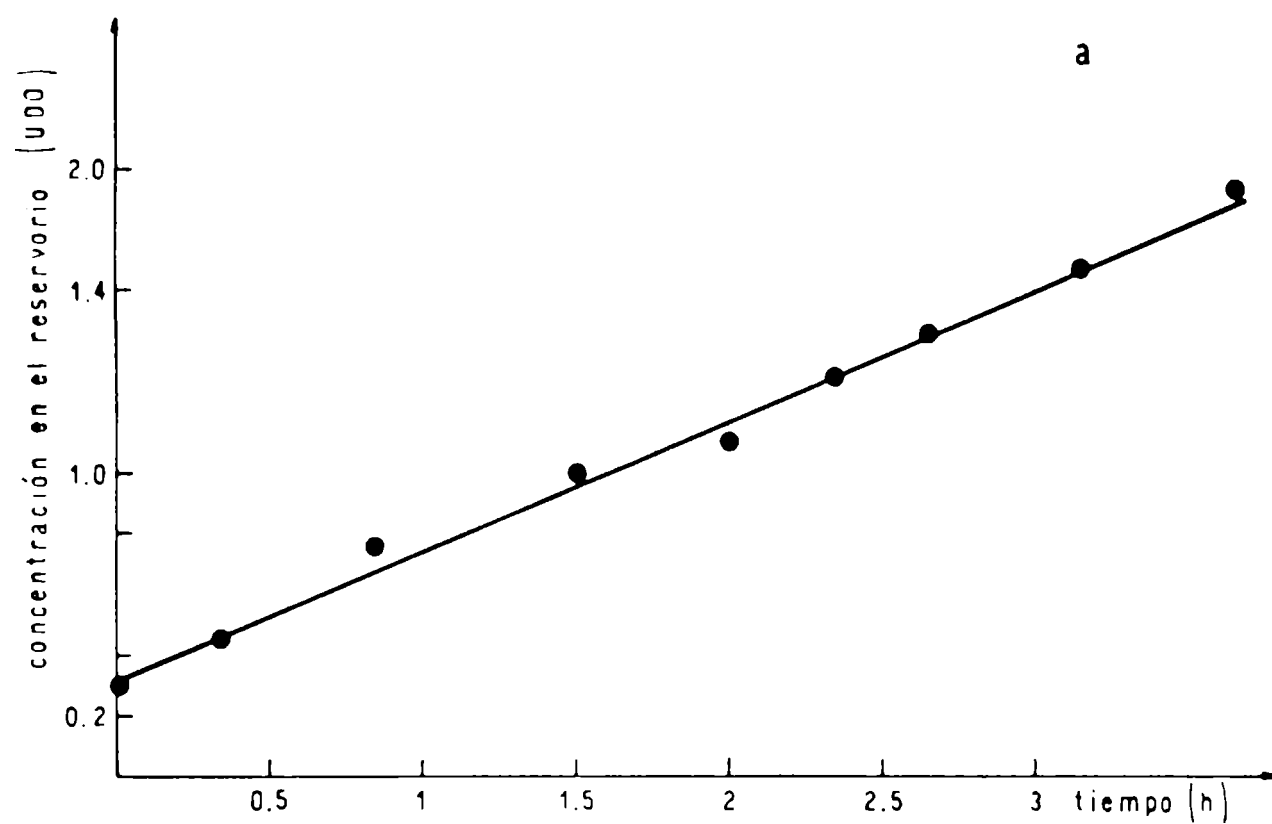


Figura 12. Variación de la concentración de sustrato en el reservorio diluído (a) y en el fermentador (b) correspondientes a la experiencia 1. $k = 0,22 \text{ UD0/h}$; $F = 0,340$

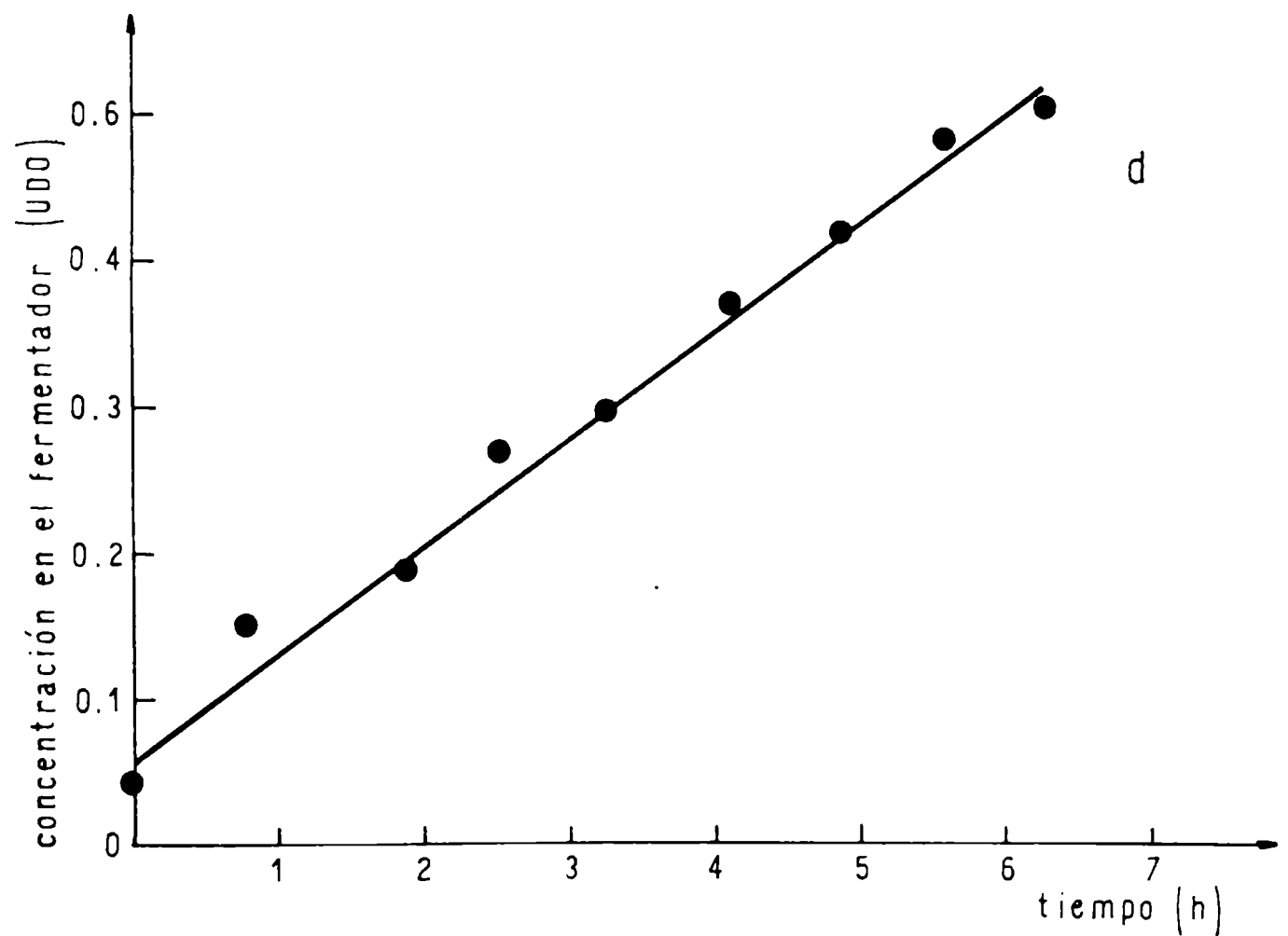
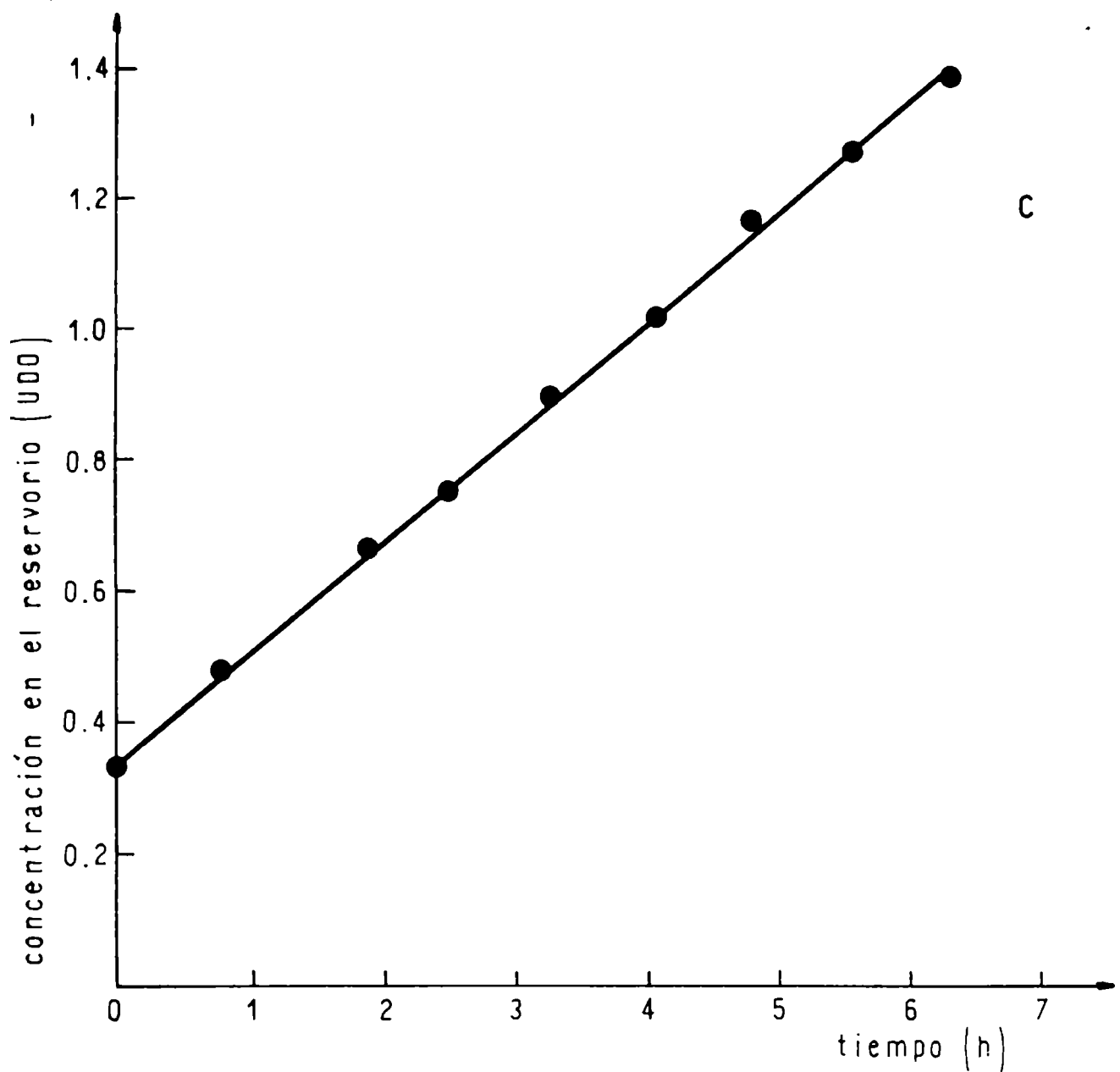


Figura 13: Variación de la concentración de sustrato en el reservorio diluído (c) y en el fermentador (d) correspondientes a la experiencia II. $k = 0,077$ UDO/h, $F = 0,123$ l/h.

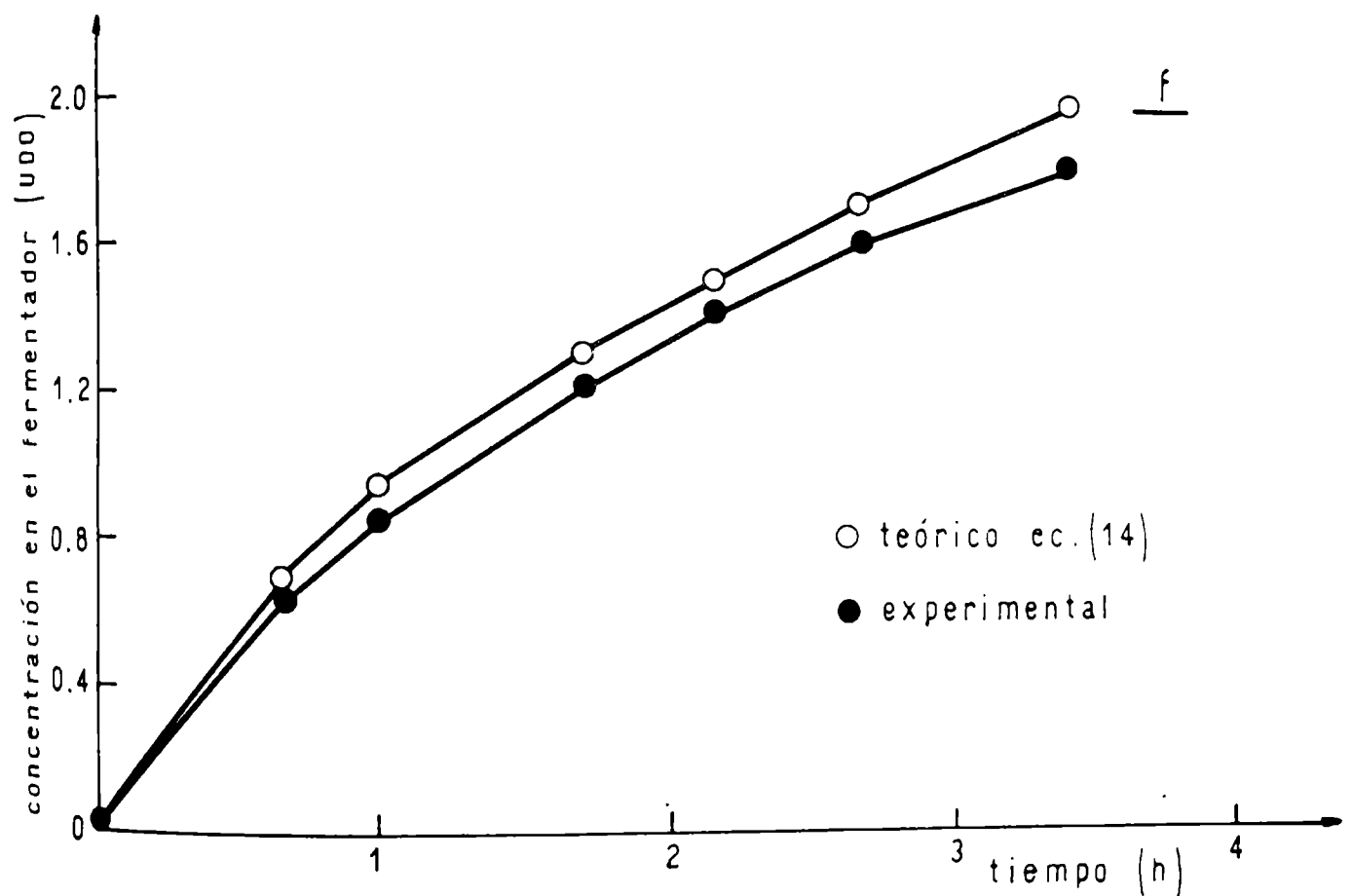
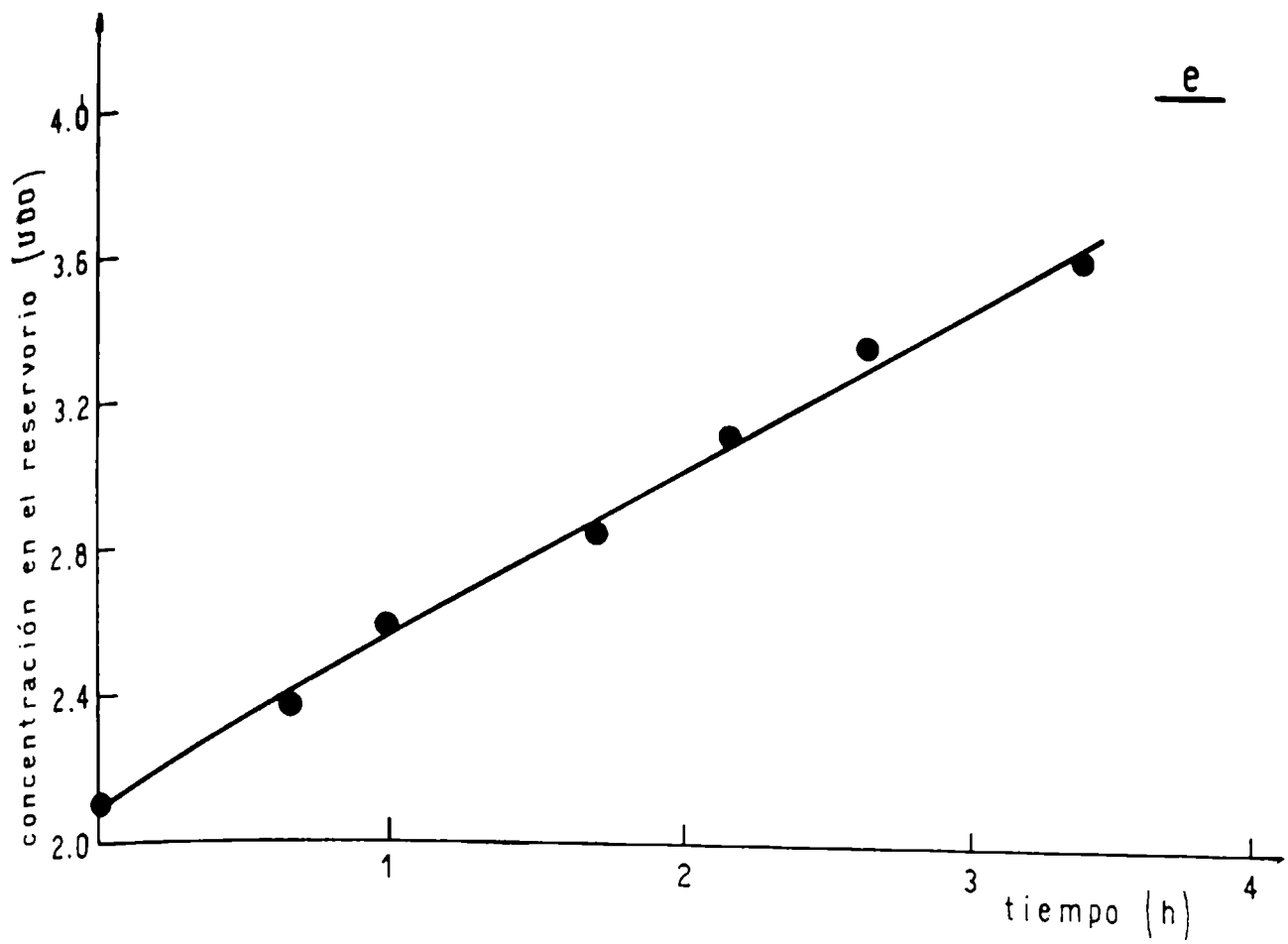


Figura 14: Variación de la concentración de sustrato en el reservorio diluido (e) y en el fermentador (f) correspondiente a la experiencia III. $F = 0,34$ l/h.

III) Finalmente, y contrastando con los casos anteriores, se realizó una experiencia en la que expreso no se utilizó ningún criterio para diseñar la alimentación, con el objeto de verificar la ecuación (14).

Las condiciones fueron las siguientes:

$$S_c = 4,0 \text{ UDO}$$

$$S_{D_0} = 2,1 \text{ UDO}$$

$$v_0 = 0,51$$

$$S_0 = 0 \text{ UDO}$$

$$F = 0,34 \frac{1}{h}$$

$$V_{D_0} = 0,75 \text{ l.}$$

En la figura 14 se observan las gráficas de $S_R(\theta)$ y S . En la primera, igual que en casos anteriores los datos experimentales se ajustan a una recta:

<u>Experimental</u> (mínimos cuadrados)
$S_R(\theta) = 2,07 + 0,48 \theta$

<u>Teórico (ecuación (22))</u>
$S_R(\theta) = 2,1 + 0,44 \theta$

En cambio el perfil de concentración, S deja de ser lineal y se aproxima más bien al valor dado por la ecuación (14).

El hecho de que el perfil obtenido en este caso no sea lineal se puede explicar del siguiente modo: Tal como se estableció anteriormente el coeficiente angular de $S_R(\theta)$ es igual a $2k$ ($0,44$ en este caso) siendo k el coeficiente angular del perfil de alimentación que se desea obtener. Pero además existe otra condición que se debe cumplir para que esto suceda, y dicha condición queda expresada por la ecuación (23):

$$S_{D_0} = S_0 + \frac{v_0 k}{F} \quad (23)$$

En base a los datos (con $k = 0,22$) es: $S_0 + \frac{v_0 k}{F} = 0,32$; pero el valor de S_{D_0} usado fue de $2,1$. Es decir que para obtener un perfil lineal (con $k = 0,22$) se tendría que haber utilizado un $S_{D_0} = 0,32$ y con este valor, mediante la ecuación (24) surge un valor de $S_c = 2,26$, es decir las mismas condiciones que en la experiencia I.

Estas experiencias muestran claramente que mediante las

ecuaciones (23) y (24) se puede diseñar una alimentación tal que genere el perfil de concentración deseado.

Aplicación del CDA al cultivo de microorganismos.

En base a las ecuaciones vistas, para realizar un CDA de acuerdo al modelo, se deben conocer con cierta aproximación los valores de u_0 , x_0 , S_0 e y provenientes de batch anteriores.

Durante un cultivo en batch el valor de u varía, y sólo permanece constante durante la fase de crecimiento exponencial, donde además se puede evaluar con facilidad; por lo tanto en las experiencias que siguen se trató de comenzar el agregado de nutrientes cuando el cultivo estuvo aún en esa fase.

Con respecto a x_0 (peso seco por unidad de volumen) se estimó en base a absorbancia conociendo de antemano una correlación entre ambos valores. Con este valor de x_0 se supuso un cierto valor de S_0 teniendo en cuenta los datos obtenidos en batch anteriores. Puesto que tanto el volumen de cultivo (v_0) como el de los reservorios (V_{0d} y V_{0c}) intervienen en los cálculos, se tuvo especial cuidado de considerar las pérdidas por evaporación durante la esterilización, las cuales resultaron ser del orden del 7%. Por tal motivo se completó en cada caso el volumen con H_2O estéril.

El diseño de las experiencias se realizó de acuerdo a la metodología ya vista, y en cada caso se buscaron expofeso condiciones diferentes a fin de probar la veracidad del modelo.

Todos los cultivos se realizaron en fermentadores New Brunswick de 7 l. de capacidad a $30^\circ C$. Los inóculos fueron preparados según se establece en materiales y métodos.

EXPERIENCIA I

El cuadro XXVII resume los resultados de la experiencia y en la figura (15) pueden observarse las curvas de crecimiento y consumo de sustrato comparadas con las correspondientes curvas teóricas, las cuales fueron calculadas con los valores que realmente se tuvieron al comenzar el CDA como así también el rendimiento celular que surgió del mismo. Con respecto a éste, se calculó en base a la ecuación (37) con $S_R(\theta)$ según la ecuación (22).

Cuadro XXVII

Valores teóricos y experimentales de un cultivo discontinuo alimentado empleando una cepa de *K. fragilis*.

	Inicial			Diseño			Final	
	Teórico ⁽¹⁾	Experim. ⁽²⁾		Teórico ⁽³⁾	Experim. ⁽⁴⁾		Teórico ⁽⁵⁾	Experim. ⁽⁶⁾
$X_o(g/l)$	0,8	0,85	$F(l/h)$	0,200	0,206 ^{**}	$X_f(g/l)$	3,11	3,5
$S_o(g/l)$	2,0	1,13	$k \frac{g \cdot l}{h}$	$0,45 \frac{g}{l \cdot h}$	0,55	$S_f(g/l)$	0,6	0,0
$V_o(l)$	1,5	1,5	$V_{oD}(l)$	0,75 l	0,75	$V_f(l)$	2,82	2,70
$u_o(h^{-1})$	0,45	0,45	$S_c(g/l)$	12,1	12,7			
y	0,50	0,66	$S_{D_o}(g/l)$	5,4	4,6			

Medio A: (g/l): Lactosa 6,0; $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ 0,2; PO_4HK_2 1,25; Acido cítrico monohidratado 0,55; Extracto de levadura 2,0; Triptosa 1,5; pH 5,7 - 5,5.

Agitación: 700 r.p.m.; Aireación: 2 l/min. (2), (4), (6) valores experimentales (1) Datos tomados de batch anteriores, (3) Parámetros calculados en base a (1) aplicando el modelo; (5) Valores calculados en base a (2) y (4); El V_f experimental es algo menor que el teórico debido a la toma de muestras; ^{**} Corresponde al promedio de no menos de cinco determinaciones realizadas durante el CDA.

En la figura 16(a) se observa la gráfica de $\ln x V$ vs tiempo, correspondiente a la etapa previa de batch. Los valores se ajustan a una recta cuya pendiente corresponde a $u_o = 0,45 h^{-1}$ y esto significa que el cultivo aún estaba en fase exponencial en el momento de comenzar la alimentación.

En la figura 16 (b) se observa la gráfica de $S_R(\theta)$ Vs tiempo, es decir la variación de la concentración de lactosa en el reservorio diluído. Si bien ya se ha mostrado anteriormente la concordancia entre el comportamiento de los reservorios y las correspondientes ecuaciones, se aprovechó la experiencia para verificar una vez más las mismas.

Los puntos de la figura se ajustan a una recta cuya ecuación es (mínimos cuadrados):

$$S_R(\theta) = 4,71 + 1,08 \theta$$

Tal como se estableció anteriormente, el coeficiente angular de la misma corresponde a $2 K$; luego surge que $K = 0,54$.

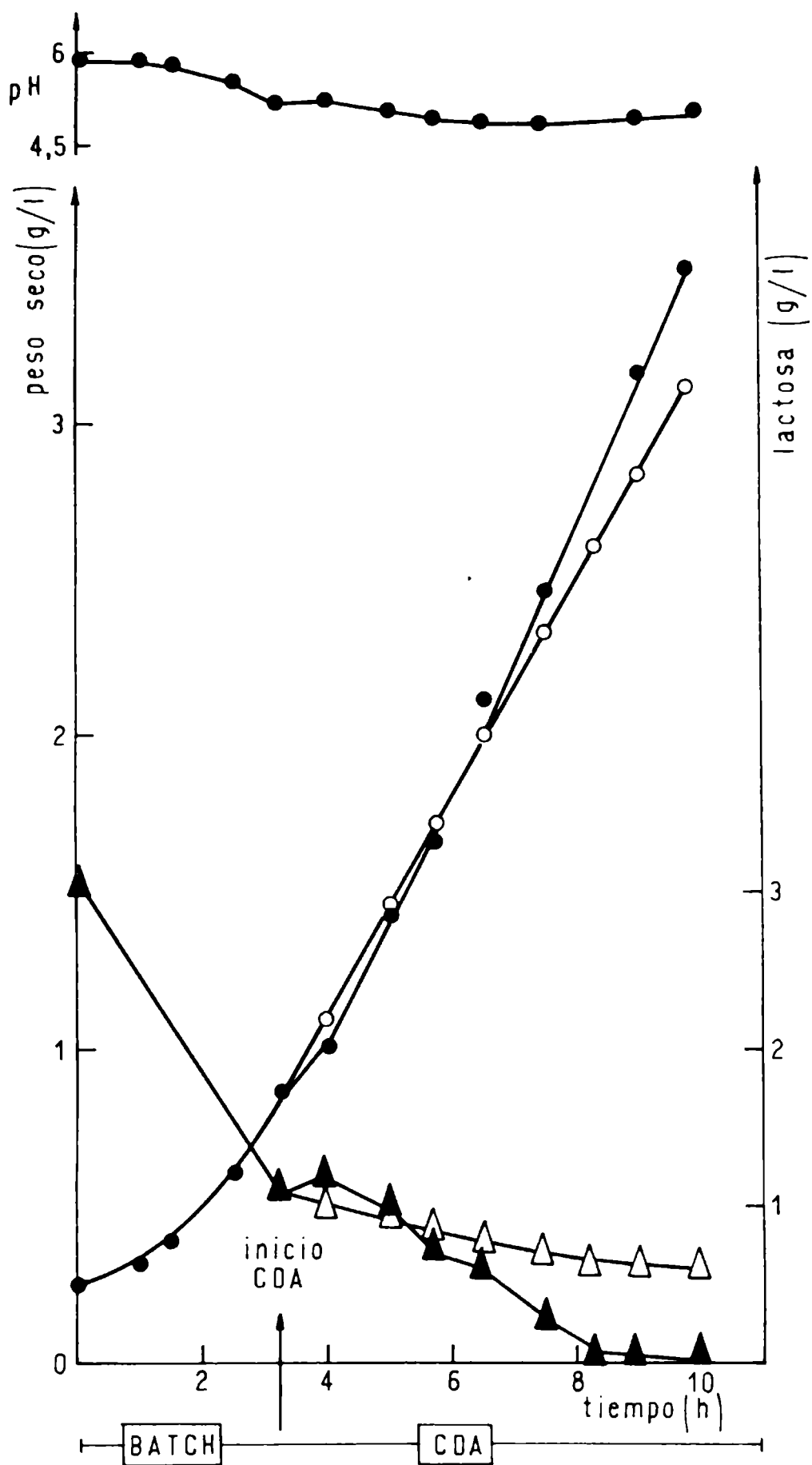


Figura 15: Crecimiento de *K. fragilis* y consumo de lactosa en un cultivo discontinuo alimentado. La flecha indica el instante en que comenzó la alimentación. (●) Concentración de microorganismos experimental; (○) concentración de microorganismos teórica; (▲) concentración de lactosa experimental; (△) concentración de lactosa teórica. Medio de cultivo A. Aeración 2 l/min; agitación 700 RPM.

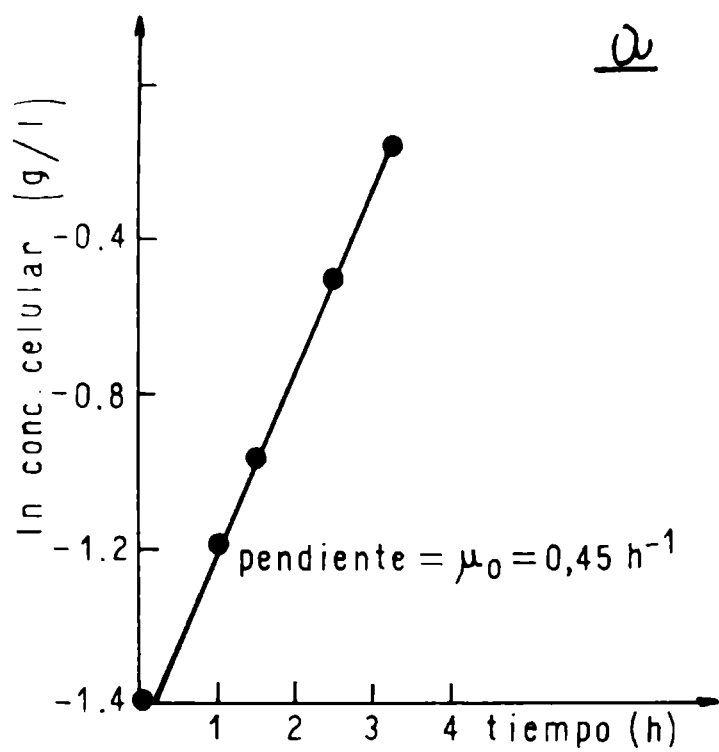


Figura 16 a: Cálculo de μ_0 de *K. fragilis* en la etapa de batch (valores correspondientes a la fig. 15).

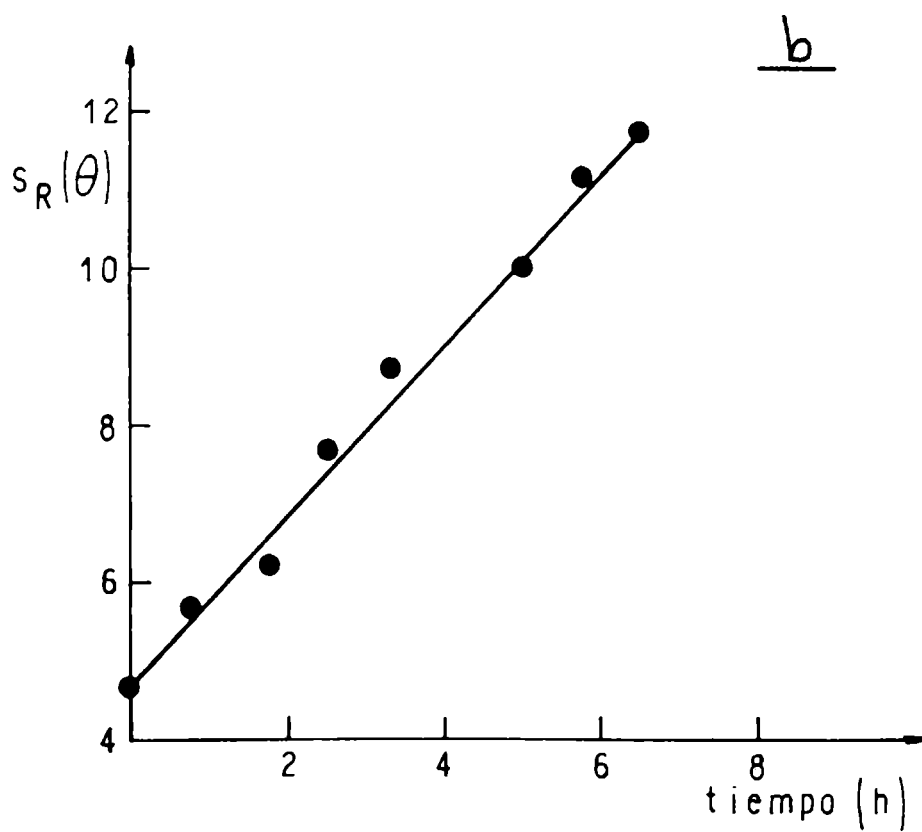


Figura 16 b: Variación de la concentración de lactosa en el caudal de alimentación correspondiente a la experiencia I (fig. 15).

Por otra parte según la ecuación (24) es:

$$K = \frac{1}{4} \frac{F}{V_{\circ D}} (S_c - S_{D\circ})$$

y reemplazando en la misma los valores experimentales de F, $V_{\circ D}$, S_c y $S_{D\circ}$ resulta $K = 0,55$ que está en total concordancia con el anterior; por lo tanto conociendo dichos valores se puede calcular K.

Cálculo del rendimiento celular:

Según el modelo, el rendimiento celular está dado por la ecuación (37) con $S_R(\theta)$ según la ecuación (22), y aplicando este método resulta $Y = 0,68$. Los límites de integración fueron entre 0 y 6,5 horas, ya que no se adicionaron la totalidad de los reservorios. Este resultado se puede verificar, independientemente de la validez del modelo, si se conocen (además de los datos experimentales del cuadro (a)) el volumen de medio de cultivo remanente de cada reservorio y las respectivas concentraciones de Lactosa.

El cuadro XXVIII reúne los datos necesarios para determinar el rendimiento celular.

Cuadro XXVIII

Condiciones iniciales y finales del CDA.

	INICIAL	FINAL
X (g/l)	0,8	3,5
S (g/l)	1,13	0
V (l)	1,5	2,82
V_D (l)	0,75	0,050*
V_c (l)	0,75	0,080*
S_D	4,6	11,1
S_c (g/l)	12,7	12,7

* La pequeña diferencia de volumen equivalente a una diferencia de altura, es atribuible a la pérdida de carga a través de la conexión entre ambos reservorios.

El total de sustrato consumido está dado por:

$$\text{Sust. consumido} = V_o D (S_c + S_{D_o}) - (V_{D_f} S_{D_f} + V_{c_f} S_{c_f}) + S_o V_o - S_f V_f = 13,1 \text{ g.}$$

La biomasa formada resulta:

$$\text{Biomasa formada} = V_f X_f - V_o X_o = 8,67 \text{ g}$$

Por lo tanto $Y = \frac{8,67 \text{ g}}{13,1 \text{ g}} = 0,66$; valor éste igual al calculado según el modelo (cuadro XXVII).

EXPERIENCIA II

En el cuadro XXIX están resumidos los resultados de esta experiencia. La figura 17 muestra que a las 6,6 horas de batch, momento en que se inició la alimentación, el cultivo estaba aún en fase exponencial con un valor de $u_o = 0,35 \text{ h}^{-1}$. Finalmente en la figura 18 se comparan las correspondientes curvas teóricas y experimentales durante el CDA el cual fue de 4,5 horas.

Cuadro XXIX
 Valores teóricos y experimentales de un cultivo discontinuo alimentado empleando una cepa de *K. fragilis*

	INICIAL		DISEÑO		FINAL	
	TEO ⁽¹⁾	EXP ⁽²⁾	TEO ⁽³⁾	EXP ⁽⁴⁾	TEO ⁽⁵⁾	EXP ⁽⁶⁾
$X_o \text{ (g/l)}$	4,5	4,6	$F \text{ (1/h)}$ 0,260	0,260	$X_f \text{ (g/l)}$ 8,1	8,2
$S_o \text{ (g/l)}$	9,0	8,1	$K(\frac{g}{l \cdot h})$ 3,3	3,07	$S_f \text{ (g/l)}$ 5,1	5,2
$V_o \text{ (l)}$	2,0	2,0	$V_{D_o} \text{ (l)}$ 0,75	0,75	$V_f \text{ (l)}$	3,17
$u_o \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,37	0,35	$S_c \text{ (g/l)}$ 72,0	68,4		
$Y \text{ (g/g)}$	0,37	0,31	$S_{D_o} \text{ (g/l)}$ 34,2	33,0		

(1); (2); (3); (4); (5); (6) idem cuadro XXVII.
 Medio C: (g/l) Lactosa 15,5; $SO_4(NH_4)_2$ 2,4; $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ 0,4; PO_4HK_2 2,5; ácido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura 2,0; pH 5,7-5,5

EXPERIENCIA III

En este caso y solamente a los fines de probar el modelo, se utilizó un microorganismo de características totalmente distintas: *Rhizobium phaseoli*, que es un fijador simbiótico de nitrógeno.

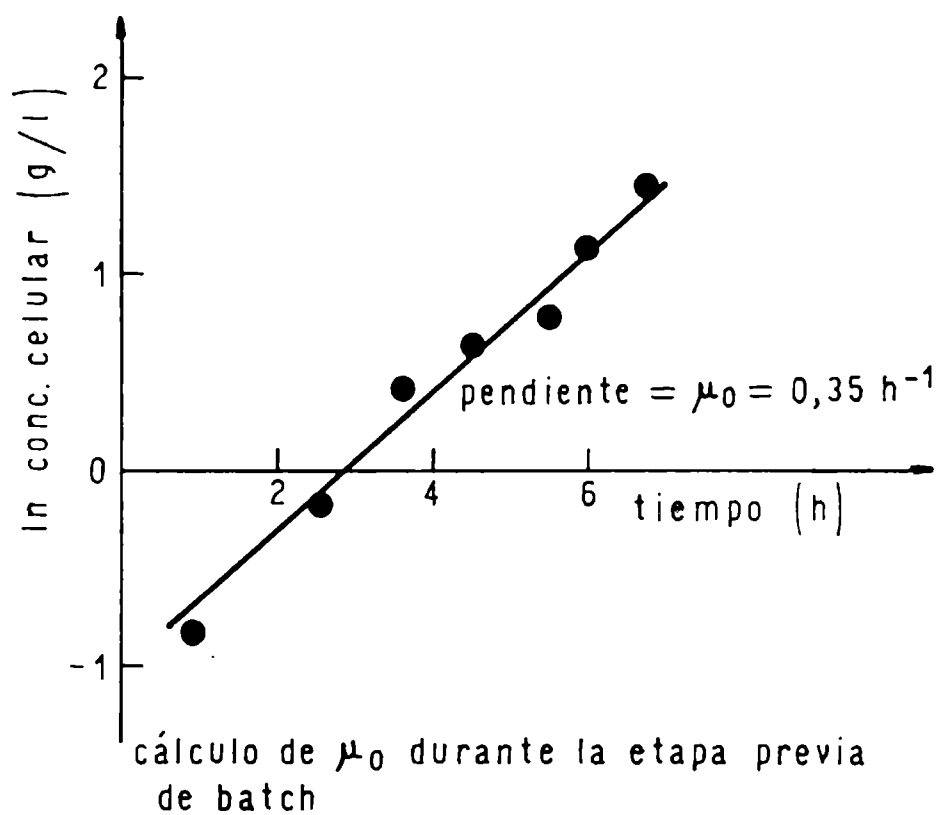


Figura 17: Cálculo de μ_0 de *K. fragilis* en la etapa de batch (valores correspondientes a la fig. 18).

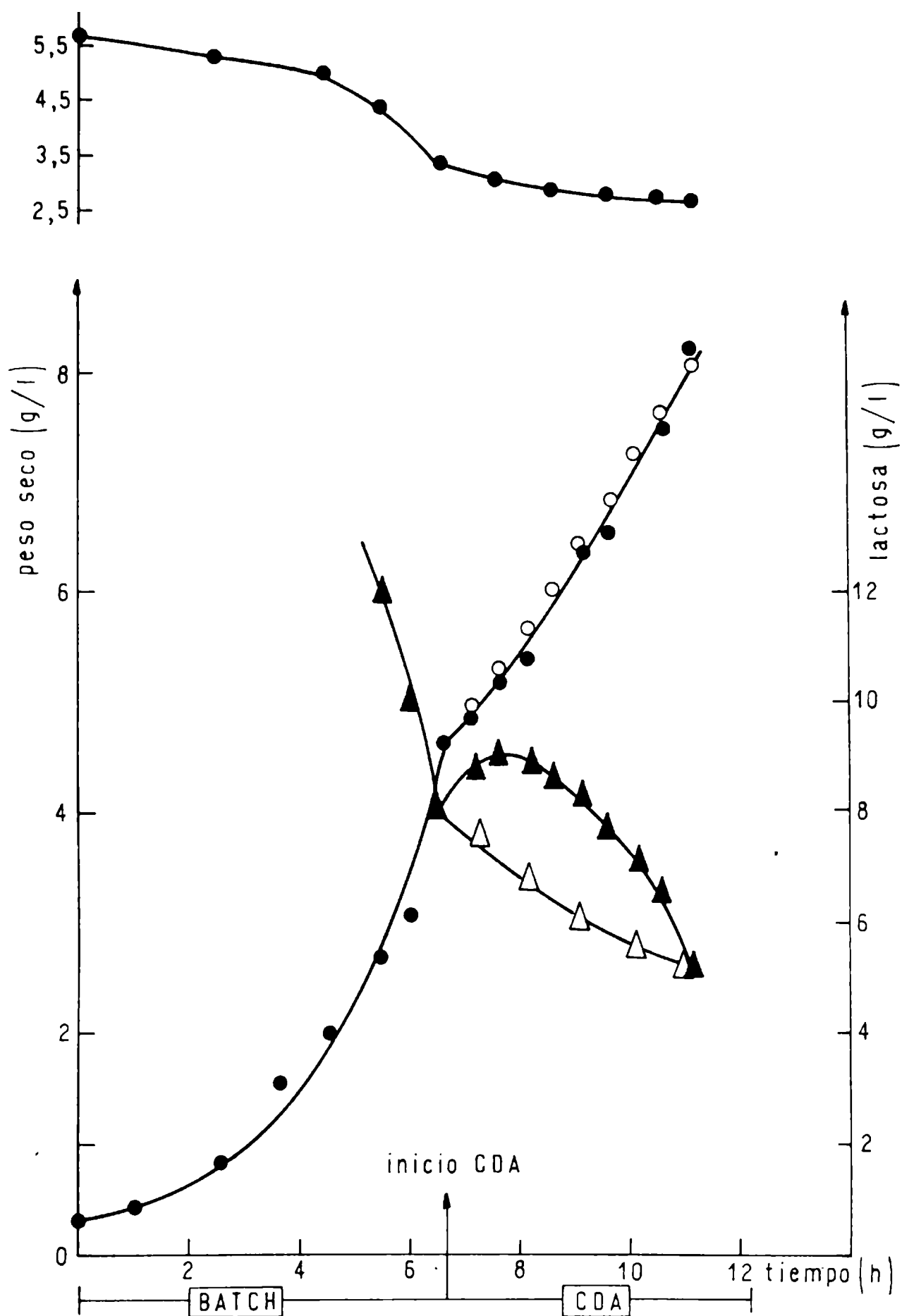


Figura 18: Crecimiento de *K. fragilis* y consumo de lactosa en un cultivo discontinuo alimentado. La flecha indica el instante en que comenzó la alimentación. (●) Concentración de microorganismos experimental; (○) concentración de microorganismos teórica; (▲) concentración de lactosa experimental; (△) concentración de lactosa teórica. Medio de cultivo C. Aeración 60 l/h; agitación 800 RPM.

El valor de u_o para este microorganismo (en el medio de cultivo F) es de $0,14\text{ h}^{-1}$ y por lo tanto bastante inferior al de *K fragilis*; además no es tan exigente en cuanto a suministro de O_2 se refiere. Estas dos características permiten realizar un diseño totalmente distinto a los anteriores y efectuar un CDA que dure, no 5 o 6 horas como los anteriores, sino alrededor de dos días.

El cuadro XXX resume los resultados de esta experiencia, y en la figura 19 se observan las curvas de recuento celular y sacarosa teóricas y experimentales. La fig. 20 muestra el cálculo correspondiente a la etapa previa de batch.

Cuadro XXX
Valores teóricos y experimentales de un cultivo discontinuo alimentado empleando una cepa de *R. phaseoli*.

INICIAL			DISEÑO			FINAL		
TEO ⁽¹⁾	EXP ⁽²⁾		TEO ⁽³⁾	EXP ⁽⁴⁾		TEO ⁽⁵⁾	EXP ⁽⁶⁾	
$x_o(\frac{cel}{l})$	6.10^{12}	6.10^{12}	F(l/h)	0,040	0,043	$x_f(\frac{cel}{ml})$	$4,8.10^{13}$	$5,0.10^{13}$
$s_o(g/l)$	6	8,6	$K(\frac{g}{l.h})$	0,62	0,64	$s_f(g/l)$	4,3	1,5
$v_o(1)$	2	2	$v_{oD}(1)$	1,0	1,0	$v_f(1)$	4,0	---
$u_o(h^{-1})$	0,14	0,18	$s_c(g/l)$	99,0	96,0			
$\gamma(\frac{cel}{g})$	$1,1.10^{12}$	$1,33.10^{12}$	$s_{D^o}(g/l)$	37,0	36,0			

(1); (2); (3); (4); (5); (6) Idem cuadro XXVII.
Agitación: 400 rpm; Aeración: 3 l/min; Medio F: (g/l) Sacarosa 10,0; peptona 2,0; Extracto de levadura 2,0; ClNa 0,1; $SO_4Mg.7H_2O$ 0,2; PO_4H_2K 0,75; PO_4HK_2 0,60; $Cl_3Fe.6H_2O$ (10% p/v) 0,1 ml/l; $SO_4Mn.4H_2O$ (10% p/v) 0,1 ml/l. Temperatura 30°C.

En el transcurso de 46 horas se adicionó la totalidad del volumen de medio de cultivo contenido en los reservorios, por lo tanto el valor de F experimental será: $F = \frac{2.l}{46.h} = 0,043\text{ l/h}$.
Corresponde verificar si en esta ocasión también el modelo permite calcular el rendimiento celular, para lo cual se sigue la misma metodología que en la experiencia I, considerando que en este caso será:

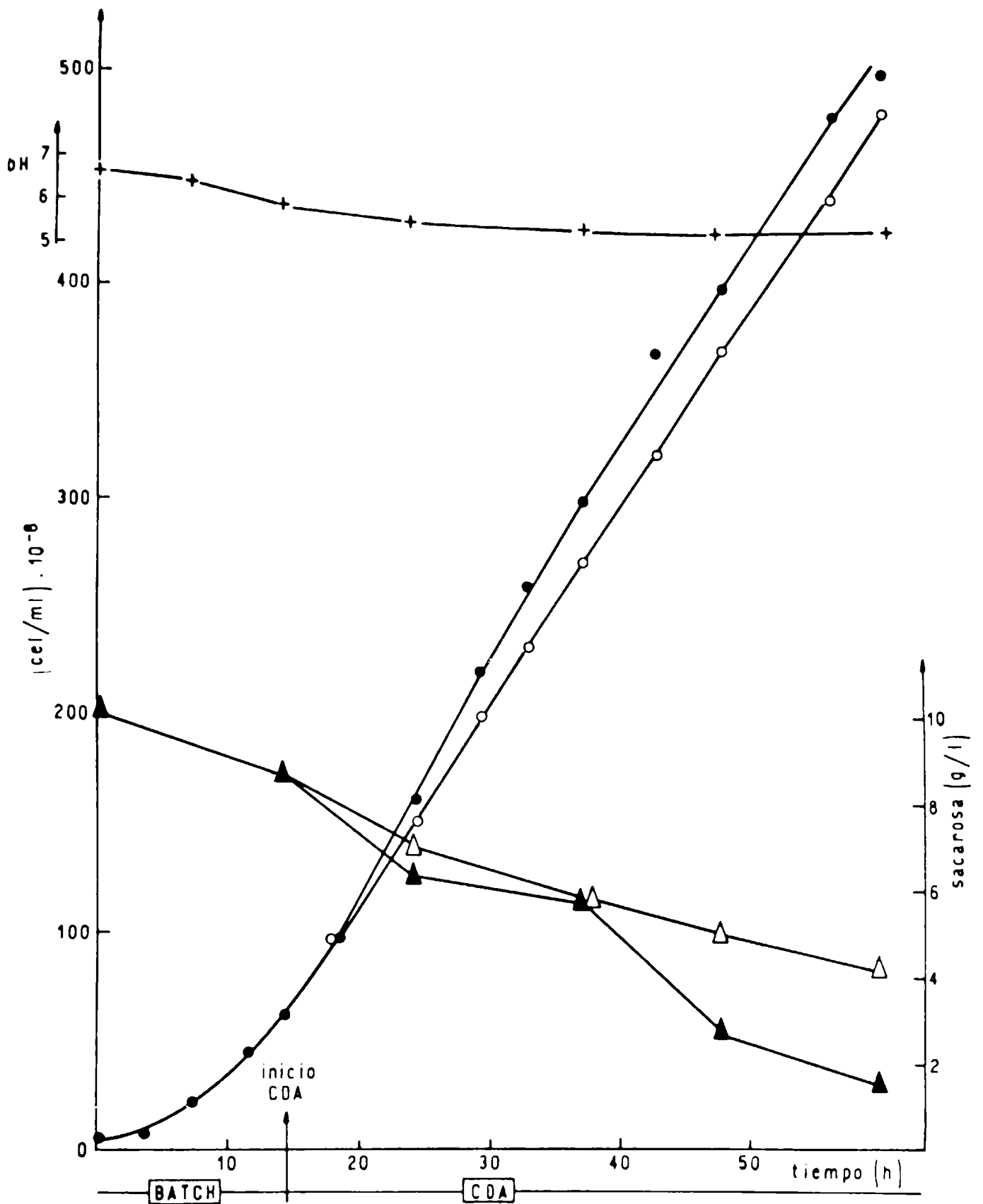


Figura 19: Crecimiento de *R. phaseoli* y consumo de sacarosa en un cultivo discontinuo alimentado. La flecha indica el instante en que comenzó la alimentación. (●) Conc. de microorganismos experimental; (○) conc. de microorganismos teórica; (▲) conc. de sacarosa experimental; (△) conc. de sacarosa teórica. Medio de cultivo F. Aeración 3 l/min., agitación 600 RPM.

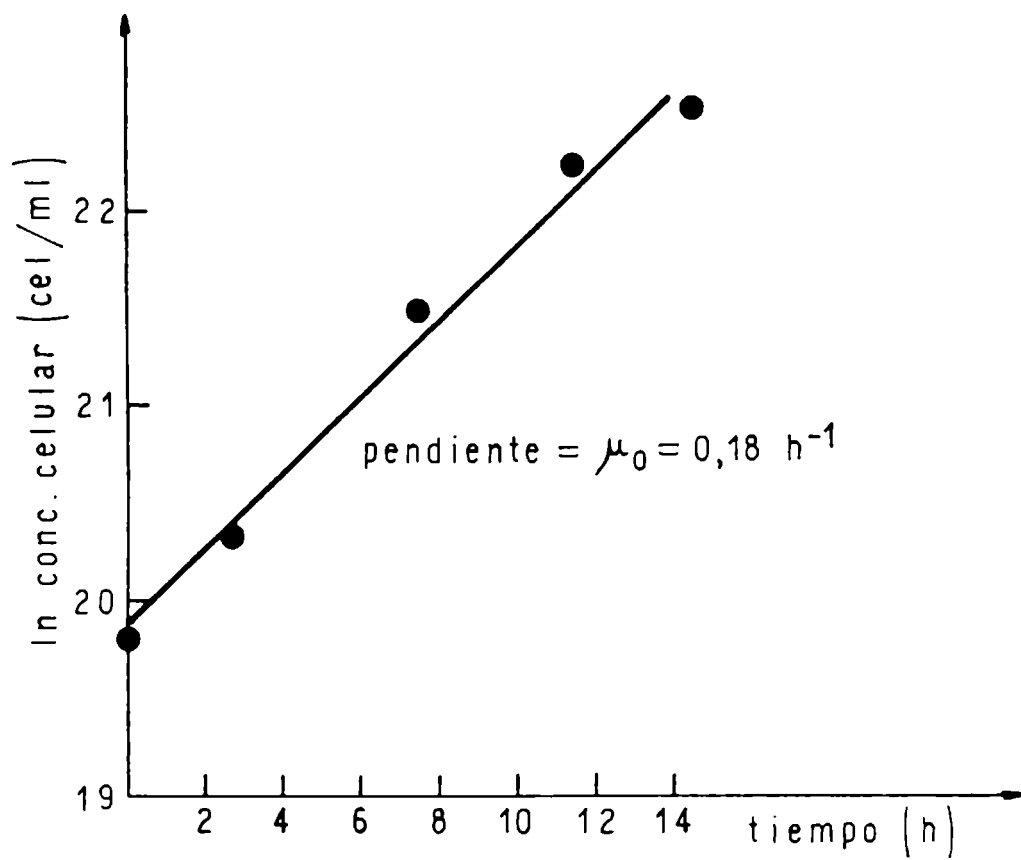


Figura 20: Cálculo de μ_0 de *R. phaseoli* en la etapa de batch (valores correspondientes a la fig. 19).

$V_{cf} = V_{df} = 0$; por lo tanto el sustrato consumido estaría dado por:
 $\text{sustr. consumido} = V_o(S_c + S_{D_o}) + S_o V_o - S_f V_f = 143,2 \text{ g}$
 $N^\circ \text{ de células formadas} = V_f X_f - V_o X_o = 1,88 \cdot 10^{14} \text{ células,}$
 con estos valores resulta $Y = 1,31 \cdot 10^{12} \text{ cel.}$ Este valor que surge de los datos experimentales concuerda perfectamente con el obtenido según el modelo.

De las tres experiencias surge que el modelo predice aceptablemente la concentración de biomasa en cada instante, mientras que la de sustrato limitante tiende a tomar valores inferiores a los teóricos en las experiencias I y III. En la experiencia II la concentración de sustrato experimental está por encima de la teórica, pero de haberse continuado el CDA, por la tendencia que se observa, es claro que con el tiempo hubiese tomado valores inferiores.

Es remarcable la buena predicción de la concentración de biomasa que, en última instancia, es el objetivo primordial.

Otro aspecto positivo del modelo es que realmente a partir de datos tomados de un Batch se puede diseñar el correspondiente CDA con el consecuente ahorro en el número de experiencias necesarias para ajustar el sistema. Por ejemplo: si la concentración de nutrientes en la alimentación hubiese sido muy baja con respecto al caudal, sería más importante el efecto de dilución causado por éste que la velocidad de crecimiento de los microorganismos, que rápidamente agotarían el sustrato, con lo cual la concentración de biomasa disminuiría con el tiempo. En el caso contrario, la concentración de biomasa aumentaría con el tiempo, pero también lo haría la de sustrato limitante. Las experiencias realizadas muestran claramente que dentro de ciertos límites la evolución de los cultivos transcurrió según lo previsto por el modelo, el cual se basa en datos obtenidos de los respectivos cultivos en batch.

El rendimiento celular presenta diferencias con respecto a los correspondientes en batch en cada caso. En la experiencial se observa un aumento de $Y = 0,50$ en batch a $Y = 0,66$ en CDA. Tal incremento podría deberse a que al ser la lactosa el sustrato que limita el crecimiento y mantenerse ésta a valores relativa-

mente bajos durante el CDA, la levadura habría utilizado la fuente de nitrógeno que está en ligero exceso (triptosa) como ~~fuente de carbono y energía~~. Otra posibilidad es que al mantenerse bajo el nivel de Lactosa, ~~se evitaría el sobreflujo~~, que la conduciría a la formación de producto, (ej. alcohol) siendo por lo tanto mejor aprovechada.

En la experiencia II hay una merma del rendimiento celular de 0,37 (Batch) a 0,31 (CDA), probablemente debido a que el CDA ha transcurrido a valores de pH inferiores al óptimo (pH = 5,6), ya que al comenzar el CDA el pH es 3,4 y desciende hasta 2,6. Finalmente en la Experiencia III hay un ligero incremento del rendimiento aunque se necesitarían más experiencias para establecer si el mismo es significativo.

Independientemente de lo que ocurra con el rendimiento celular es destacable que el modelo permite su cálculo y éste concuerda con los resultados experimentales (experiencias I y III).

En lo que se refiere a la productividad y considerando que el volumen de cultivo aumenta con el tiempo, se puede definir la productividad del CDA (P_{cda}) como sigue:

$$P_{cda} = \frac{XV - X_0V_0}{\theta} \tag{39}$$

Reemplazando el valor de XV por el de la ecuación (30) se llega a que

$$P_{cda} = YF (S_0 + B + K\theta) \tag{40}$$

La productividad teórica, ecuación (40), puede ser fácilmente comparada con la experimental para cualquier tiempo de CDA. En el cuadro XXXI se comparan la productividad experimental, calculada según la ecuación (39), con la teórica en el punto final de cada una de las experiencias.

Cuadro XXXI
Comparación entre la productividad teórica y experimental

EXPERIENCIA	PRODUCTIVIDAD	
	TEORICA	EXPERIMENTAL
I	1,2 g/h	1,3 g/h
II	3,6 g/h	3,7 g/h
III	$3,8 \cdot 10^{12}$ cel/h	$4,0 \cdot 10^{12}$ cel/h

Experiencia I: Duración del CDA 6,5 h; Experiencia II: duración del CDA 4,5 h; Experiencia III: duración del CDA 46 h.

El grado de concordancia es bueno, lo cual nos dice que el modelo permite predecir la concentración de biomasa en función del tiempo. Pero aún más importante es que mediante la ecuación (40) es posible optimizar el CDA para obtener la máxima productividad.

Por simplicidad, se puede eliminar K de la ecuación (40) reemplazándolo por su valor correspondiente según la ecuación (36); de este modo P_{cda} queda expresado en función de F.

$$P_{cda} = P_o + (F u_o X_o - \frac{Y F^2 S_o}{V_o}) \theta \tag{41}$$

Donde $P_o = u_o X_o V_o$.

En la figura 21 se observa la gráfica de $P_{cda} - P_o$ en la función de F para distintos valores de θ (curvas de nivel).

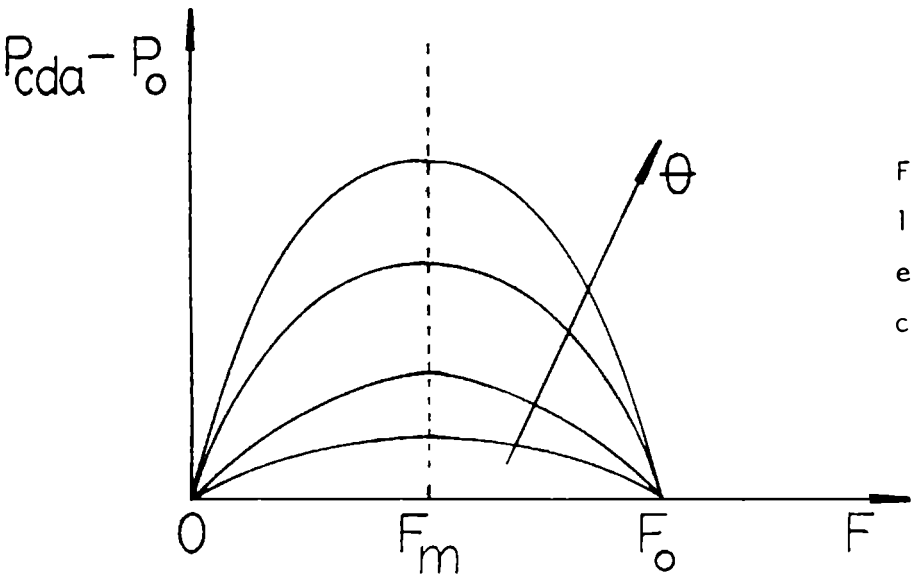


Fig. 21: Variación de la productividad durante el CDA en función del caudal de alimentación(F)

Tanto a $\theta = 0$ como $F = 0$ y $F = F_o$ resulta $P_{cda} = P_o$. Existe un $F = F_m$ para el cual, a un tiempo dado, P_{cda} es máxima.

$$F_m = \frac{u_o X_o V_o}{2 Y S_o} \tag{42}$$

Mediante la ecuación (36) resulta, reemplazando F por F_m :

$$K_m = \frac{u_o X_o}{2 Y} \tag{43}$$

donde K_m representa el valor de K para la máxima productividad.

Luego las ecuaciones (42) y (43) permiten diseñar una alimentación tal que la productividad sea máxima.

No se han realizado experiencias en condiciones de máxima productividad, pero el hecho de que la P_{cda} teórica y experimental sean semejantes (Cuadro XXXI) lleva a pensar que la P_{cda} máxima también se tiene que cumplir ya que no es más que un caso particular.

Valor de u durante el CDA:

Es evidente que el valor de u durante el CDA es distinto al que tenía en Batch y siempre menor que u_0 . Esto se puede ver mediante el siguiente ejemplo:

Supongamos que en la experiencia I el valor de u durante el CDA se mantiene constante e igual a u_0 . Luego la cantidad total de biomasa al final de la experiencia estará dada por:

$$XV = X_0 V_0 e^{u_0 \theta}$$

Reemplazando por los valores correspondientes se tiene que $XV = 23,7$ g de biomasa, contra los que realmente se obtuvieron, que fueron 8,67 g; la misma discrepancia se observó en las experiencias II y III; luego el valor de u debe ser menor que u_0 . Este resultado surge de la ecuación (30):

$$XV = X_0 V_0 + YF \left[(S_0 + B) \theta + K \theta^2 \right] \quad (30)$$

Calculando $\frac{d(XV)}{d\theta}$ y recordando que ésta es igual a uXV (ec.(25)) se obtiene:

$$\frac{d(XV)}{d\theta} = YF(S_0 + B + 2K\theta) = uXV \quad (44)$$

de donde:

$$u = \frac{YF(S_0 + B + 2K\theta)}{X_0 V_0 + YF(S_0 + B) \theta + K\theta^2} \quad (45)$$

Puesto que el denominador de la ecuación (45) aumenta con el tiempo más rápidamente que el numerador, el valor de u disminuye a medida que transcurre el CDA. Tal disminución no puede atribuírse a que la concentración de sustrato limitante no alcance a ser saturante (suponiendo una relación entre u y S como en la ecuación de Monod) ya que, al menos, en las experiencias II y III la mayor parte del CDA transcurrió a concentraciones

de sustrato relativamente elevadas.

Independientemente de cuál sea el motivo real, parecería que existe una especie de control externo sobre el cultivo a través de la alimentación.

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE MUTANTES RESPIRATORIAS EN EL INOCULO SOBRE EL RENDIMIENTO EN BIOMASA DE K. FRAGILIS

En la bibliografía consultada referente a la producción de proteínas unicelulares a partir de levaduras no se ha encontrado ningún trabajo que centre su estudio en la composición del inóculo, más concretamente a la presencia, en esa población, de mutantes respiratorias, las cuales muestran una frecuencia relativamente alta en repiques de células normales. Este aspecto es de gran relevancia debido a que las células mutantes han perdido total o parcialmente la capacidad para utilizar O_2 como aceptor final de electrones, como consecuencia de una alteración a nivel de la cadena de citocromos⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. Esta alteración provoca una menor eficiencia para la utilización del sustrato (fuente de carbono y energía), lo cual conduce a una disminución del rendimiento celular, ya que la energía necesaria para el crecimiento se obtiene principalmente a partir de la glucólisis favoreciéndose, entonces, la formación de etanol⁽⁴⁶⁾. Debido a la alteración en la cadena de citocromos esta mutante no puede crecer a expensas de azúcares que no fermentan, como Lactato, Acetato, Glicerol, Piruvato, etc., siempre y cuando la deficiencia respiratoria sea total, es decir $q_{O_2} = 0$.

Por otra parte dichas mutantes se encuentran normalmente en la población^(48,44) de levaduras y algunas cepas haploides particularmente inestables pueden contener una alta proporción de mutantes, aún cuando se las cultive en condiciones normales⁽⁴⁴⁾.

Básicamente se describen dos tipos de mutantes respiratorias^(47,44)

- a) Vegetativas
- b) Nucleares

El primer caso presenta herencia citoplasmática, por lo tanto cuando se cruzan células normales con mutantes, la progenie resulta en un 100% formada por células normales.

En la actualidad se sabe que en este caso, la alteración genética está a nivel del DNA mitocondrial. Además, en el caso de células parcialmente deficientes para respirar, se pueden localizar por métodos histoquímicos, dentro de una misma célula de levadura, mitocondrias funcionales y no funcionales; y en este último caso con distintos grados de alteración (citocromo

oxidasa (+) succinato deshidrogenasa (-) etc.), lo que da como resultado global una pérdida parcial de la capacidad respiratoria de la célula⁽⁴⁹⁾.

En las de tipo nuclear se piensa que la alteración es esencialmente en los cromosomas, ya que cuando mutantes de esta clase se cruzan con células normales la progenie presenta la típica segregación Mendeliana. Debido a que a través de la literatura las mutantes respiratorias han recibido distintos nombres (petite colonia, variantes W, aer, mutantes Mk, R-, etc.) en lo que sigue se las nombrará como RD (respiración deficiente) adoptando la terminología utilizada por Nagai, S. y col. en su extensa revisión sobre el tema⁽⁴⁴⁾. Como contrapartida a las células normales se las designará como RC.

Métodos simples para identificar mutantes RD:

Originalmente se las identificaba por el tamaño de la colonia cuando crecían en medio sólido con poca fuente de carbono^(44,48), y de ahí el nombre de "petite colonia", pero este fenómeno no es excluyente, es decir que una colonia más pequeña, con respecto a la RC, no implica necesariamente una mutante de tipo RD⁽⁴⁴⁾.

También se ha recurrido a la incapacidad de las células RD para crecer a expensas de sustratos no fermentables (ej. Lactato) mientras que las RC lo hacen normalmente. Una extensión de este método permite estimar, mediante recuento en caja de petri qué proporción, de una población dada, está constituida por células RD realizando plaqu coastos simultáneos sobre medios que contengan glucosa y lactato respectivamente. En el primero formarán colonias tanto las RC como las RD, mientras que en el segundo sólo la RC. El método es especialmente sensible cuando la proporción de RC dentro de la población es baja⁽⁵¹⁾ (ver materiales y métodos). Este método no es aplicable cuando la mutante RD es parcialmente deficiente, ya que en tal caso dará también colonias en un medio con lactato u otra fuente no fermentable.

Existen varios métodos que se basan en un cambio de coloración para diferenciar ambos tipos de células. Uno de los primeros consiste en detectar la producción de alcali cuando las células se cultivan a 30°C en un medio líquido que contiene esencialmente acetato de sodio, peptona y rojo de fenol como indicador. Las células RC provocan el viraje del indicador dentro de

101

las 24 horas de incubación mientras que las RD aún después de cinco días, no modifican el color. Si la deficiencia respiratoria es parcial el viraje se produce dentro de las 48 horas⁽⁵⁰⁾.

Entre las técnicas descriptas para el reconocimiento de mutantes RD que se realizan en caja de Petri pueden citarse:

- a) La que utiliza trifeniltetrazolium como revelador⁽⁵²⁾ (las colonias RC toman color rojo, mientras que las RD permanecen blancas).
- b) Reducción del Na_2TeO_3 ⁽⁵³⁾ (células RC reducen el TeO_3 a Te^0 y; por lo tanto dan colonias negras; las células RD no lo reducen y dan colonias blancas).
- c) También se ha mostrado muy útil el uso de mezclas de colorantes (ej. Eosina, Azul tripan) que adicionados al medio de cultivo, en el orden de ppm, provocan una clara diferenciación entre colonias formadas por RC y RD. En el caso de estos dos colorantes las células RC dan colonias de color violeta claro mientras que RD rojo intenso⁽⁵⁴⁾. (Ver materiales y métodos).

El objetivo de esta parte del trabajo es estudiar cómo influyen, principalmente sobre el rendimiento celular, distintas proporciones de mutantes RD en el inóculo. Para ello se realizaron procesos de desarrollo celular utilizando inóculos constituidos por poblaciones con distintos porcentajes de mutantes RD. Se determinó la biomasa formada así como la evolución de la población a lo largo del proceso. Paralelamente se determinaron otros parámetros como: consumo de O_2 , producción de CO_2 , consumo de fuente de carbomo y producción de etanol.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inducción de mutantes RD.

La inducción de mutantes RD se realizó según la técnica propuesta por Nagai, S.⁽⁷⁰⁾. El método consiste básicamente en incubar células normales RC en un medio que contiene: (g/l) Extracto de levadura 2,0; peptona 1,8; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1,5; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,0; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; Acriflavina. Se ensayaron cinco concentraciones de Acriflavina: 1,5; 4; 8; 13 y 20 mg/l, de las cuales sólo la última, 20 mg/l, se mostró efectiva para inducir mutantes pero a cambio de una gran mortandad, ya que luego de incubar 4 días a 30°C el recuento en placa sobre medio diferencial arrojó un valor de $2,8 \times 10^6$ cel/ml. para el control (sin acriflavina), mientras que para la muestra tratada con acriflavina solamente se obtuvieron 100 cel/ml. Es decir que en placas sembradas con 0,2 ml de la muestra sin diluir, sólo se encontraron entre 15 y 25 colonias, de las cuales dos colonias, término medio, presentaban coloración rojo púrpura correspondientes a mutantes RD.

Las colonias con características de RD conjuntamente con una tomada al azar que por su coloración presentaba características de RC fueron repicadas en el medio D, con el objeto de estudiar posteriormente el comportamiento respiratorio de las mismas.

En el cuadro XXXII pueden observarse las características de algunas de las colonias repicadas frente a la cepa normal, RC, como referencia. Las colonias rotuladas como D_2^1 y EM tenían color rojo púrpura (en el medio diferencial) siendo la primera pequeña y la segunda mediana con respecto a la colonia normal (color violeta) rotulado como N0. Esta última colonia se repicó con el objeto de verificar la confiabilidad del método de plaqueo para diferenciar colonias normales y mutantes.

Si se compara el q_{0_2} de las colonias denominadas N0 para lactato con el correspondiente de las colonias RC se observa una gran similitud, mientras que para las colonias EM y D_2^1 el consumo es escaso y nulo, lo que indicaría que se está en presencia de una mutante respiratoria parcial y total respectivamente. En el caso de esta última se observa que fermenta la

lactosa a una velocidad comparable a la cepa normal, ya que los $q_{CO_2}^{(N_2)}$ son semejantes.

Se seleccionó la colonia D_2' para continuar los estudios, y con el objeto de verificar la homogeneidad de la cepa, se sembraron $6 \cdot 10^3$ células en una caja de Petri conteniendo medio selectivo (Lactato) e igual cantidad en otra con medio control (glucosa) encontrándose una pátina en esta última y ninguna colonia en la primera. Como control de placa se sembraron células RC en el medio selectivo y dieron colonias. En base a las pruebas realizadas se rotuló a D_2' como RD.

Con la mutante así obtenida y la cepa normal, se realizaron cultivos en tanques agitados utilizando inóculos con distintas proporciones de RC/RD, para lo cual se procedió de la siguiente forma: Se cultivó cada cepa separadamente en erlenmeyers de 1 litro con 100 ml de medio de cultivo C, luego, previo recuento en cámara de Neu Bauer, se centrifugaron (en forma estéril) y resuspendieron cada uno, en un volumen adecuado de medio C fresco. Se preparó una mezcla con ambas suspensiones para obtener aproximadamente la relación RC:RD deseada.

La mezcla de ambas cepas preparada en la forma indicada se transfirió a un tanque agitado en cantidad necesaria para lograr una concentración inicial de microorganismos del orden de 0,4 g/l. Los cultivos se realizaron en tanque agitado a 800 r.p.m. con una aeración de 60 l/h, según el esquema indicado en materiales y métodos.

El cuadro XXXIII presenta un resumen de los datos obtenidos a través de una serie de cinco experiencias donde la población inicial se hizo variar desde 0% a 100% de RD; la cantidad total de O_2 consumido como así también la de CO_2 producido fue estimada calculando el área bajo las curvas de velocidad de consumo de O_2 y producción de CO_2 respectivamente (figuras 21 - 25). Resulta interesante destacar que salvo para el caso en que la población está formada por el 100% de RC el cociente respiratorio instantáneo se aleja, como cabe esperar, bastante de 1 por lo cual se comete un gran error si se calculan las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 recurriendo a un balance que no contemple esta eventualidad (ver materiales y métodos). Como un claro ejemplo puede citarse el caso en que se realizó el cultivo con

100% de RD. En esta oportunidad también se midió el % de O_2 en los gases de salida del fermentador y se encontró que a las 6 horas de cultivo el mismo era de 20,2% mientras que el de CO_2 3,3%, lo cual daría una velocidad de consumo, suponiendo un balance simple, de:

$$\frac{60 \text{ l/h} (20,2 - 21,0)}{31} \cdot \frac{10^3 \text{ ml/l} \cdot 273^\circ \text{K}}{295^\circ \text{K}} = \frac{-148 \text{ ml } O_2}{1 \cdot \text{h}} \text{ (CN)}$$

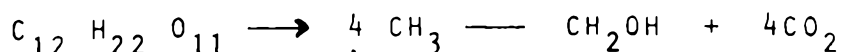
Si se calcula la velocidad de consumo considerando el efecto de "dilución" del O_2 que causa el CO_2 producido da un valor de:

$$\frac{0,79 \cdot 60 \text{ l/h}}{3,01} \left(\frac{0,202}{1-0,202-0,033} - \frac{0,21}{1-0,21} \right) \frac{273 \text{ K}}{295 \text{ K}} \cdot 10^3 \text{ ml/l} = \frac{-26 \text{ ml } O_2}{1 \cdot \text{h}}$$

Es decir que si se calculase la velocidad de consumo de O_2 mediante la primera expresión, se cometería un error superior al 500%. La figura 21 muestra que para el caso de 100% RC la lactosa es metabolizada principalmente por vía oxidativa ya que el cociente respiratorio se mantiene cercano a 1 durante la mayor parte del ensayo, mientras que en las experiencias 2, 3 y 4 ambas curvas se separan hasta el caso límite, 100% RD, en que el consumo de O_2 es prácticamente nulo (fig. 22-25). El pequeño pico de consumo que se observa en el último caso, a las 6 horas de cultivo, puede ser atribuido a O_2 utilizado no para la obtención de energía sino para la síntesis de ergosterol y ácidos grasos no saturados, ambos necesarios para la formación de la pared celular⁽⁵⁵⁾.

En las cinco experiencias la lactosa fue totalmente consumida siendo la concentración prácticamente nula en el punto correspondiente a la máxima velocidad de producción de CO_2 .

La cantidad de etanol producido aumenta conforme lo hace el % RD en el inóculo, y en el caso de 100% RD se corresponde este químicamente con los moles de CO_2 producido de acuerdo a la reacción global:



Según la misma se deben producir tantos moles de etanol como de CO_2 , y en este caso se tuvo:

$$\text{moles de } CO_2 \text{ producidos} = \frac{2890 \text{ ml}}{22.400 \frac{\text{ml}}{\text{mol}}} = 0,129 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

moles de etanol producidos = $\frac{6 \text{ g/l}}{46 \text{ g/mol}} = 0,130 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$

Esto no hace más que comprobar que la mutante RD obtuvo la energía sólo por vía glucolítica. Sin embargo en las experiencias 1, 2, 3 y 4 el exceso de CO₂ producido con respecto al O₂ consumido no se corresponde con la cantidad de etanol formada, siendo los moles de etanol formados siempre menor que los de CO₂ producidos y la diferencia es más notable a medida que aumenta el porcentaje de RC, lo que indicaría que las células normales estarían utilizando el etanol producido por las RD.

Debe considerarse también que la cantidad de etanol obtenido en cada caso dependerá del momento en que se "pare" el cultivo. En este caso se utilizó como criterio para finalizar el cultivo el momento en que éste entró en la fase estacionaria.

Resulta también de interés la comparación de las velocidades específicas de crecimiento. Según la figura 26 éstas fueron del orden de 0,37 h⁻¹ para las experiencias 1, 2, 3 y 4 independientemente del porcentaje de Rc y RD en el inóculo. Sólo cuando se cultivaron 100 % de RD el valor fue de 0,27 h⁻¹.

Cuadro XXXIV
Variación de la población en función del tiempo para experiencias con distinta relación RC:RD en el inóculo

Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4		Exp. 4'	
Tiempo (hs)	% RD	Tiempo (hs)	% RD	Tiempo (hs)	% RD	Tiempo (hs)	% RD
0	11	0	37	0	79	0	74
2,5	7	2,5	43,6	2,5	84,7	2	76,6
		5	33	5	76,3	5	72,5
		7	27	6,5	74,8	6,5	70,8
12,5	6	9	24	8,5	70,3	8	58,8
		11	24	9,15	60,5	9,5	60

En el cuadro XXXIV se muestra la evolución de la población en función del tiempo para las experiencias en que el inóculo fue mixto juntamente con otra experiencia, 4', en la que se trata de reproducir las condiciones de la experiencia N°4. Los valores corresponden

a plaques realizados por cuadruplicado utilizando conjuntamente el medio selectivo y el diferencial, el cual hizo las veces de control de aquel a la vez que permitió realizar recuentos dentro de cada caja en base al diferente color de las colonias. En este caso no se consideraron las cajas que dieron menos de 30 colonias de un tipo a los fines del cálculo.

Se observa que la población se empobrece en función del tiempo con respecto a las mutantes RD, lo cual es atribuible a su menor velocidad específica de crecimiento; sin embargo en general hay un aumento del porcentaje RD a las 2,5 hs. de cultivo, probablemente debido a que poseen una menor fase de retardo que las RC, para las condiciones en que se realizó el cultivo.

Finalmente en la figura 27 se observa claramente la estrecha relación que existe entre el % RC en la población y el rendimiento celular. Tanto éste como la cantidad de biomasa formada, disminuye con el aumento de mutantes RD en la población inicial.

Cuadro XXXII

Capacidad respiratoria de la cepa normal RC y de las colonias repicadas luego del tratamiento con acriflavina.

Fuente de carbono	Cepa normal		Colonias aisladas después del tratamiento con acriflavina				
	R C		D'2		EM	NO	
	glucosa 20(g/l)	lactato de Na 10(g/l)	lactosa 15(g/l)	glucosa 20 (g/l)	lactato de Na 10(g/l)	lactato de Na 10(g/l)	
q_{O_2} ($\frac{ul}{mg \cdot h}$)	235	205	314	0	0	37	222
q_{CO_2} ($\frac{ul}{mg \cdot h}$)	244	154	320	180	0	214	--
(N2)							
q_{CO_2} ($\frac{ul}{mg \cdot h}$)	--	0	400	--	0	343	--

Medio de cultivo base (g/l): Peptona (Difco) 3,5; Extracto de levadura 3,0; PO_4H_2K 2,0; $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ 1,0; $SO_4(NH_4)_2$ 1,0. pH = 5,7. Respirómetro de Warburg convencional.

D'2 - Mutante, colonia pequeña

EM - Mutante, colonia mediana

NO - Normal

Cuadro XXXIII

Experiencias empleando inóculos con diferentes proporciones de cepa normal (RC) y una mutante deficiente respiratoria (RD) de *Saccharomyces fragilis*

Población inicial					Población final					
Exp.	%RC	%RD	Biomasa formada (g/l)	Lactosa consumida (g/l)	Total O ₂ consumido (ml/l)	Total CO ₂ producido (ml/l)	Etanol (g/l)	Etanol Teórico (g/l)	%RC	%RD
1	100	0	5,6	15,6	4.380	5.093	0,97	1,4	100	0
2	89	11	5,0	15,7	3.194	4.727	0,62	3,1	94	6
3	63	37	3,0	15,0	2.443	3.982	1,77	3,1	76	24
4	21	79	2,9	15,6	925	3.570	4,80	5,4	31,5	68,5
5	0	100	1,6	15,6	0	2.890	6,0	5,9	0	100

Medio C (g/l): lactosa 15,50; SO₄(NH₄)₂ 2,40; SO₄Mg.7H₂O 0,40; PO₄HK₂ 2,50; Acido cítrico Monohidratado 1,09; Extracto de levadura Oxoid 2,0.
Condiciones operativas: Tanque agitado 800 rpm; aire 60 l/h; volumen de cultivo 3,0 l; Temp. 30°C.

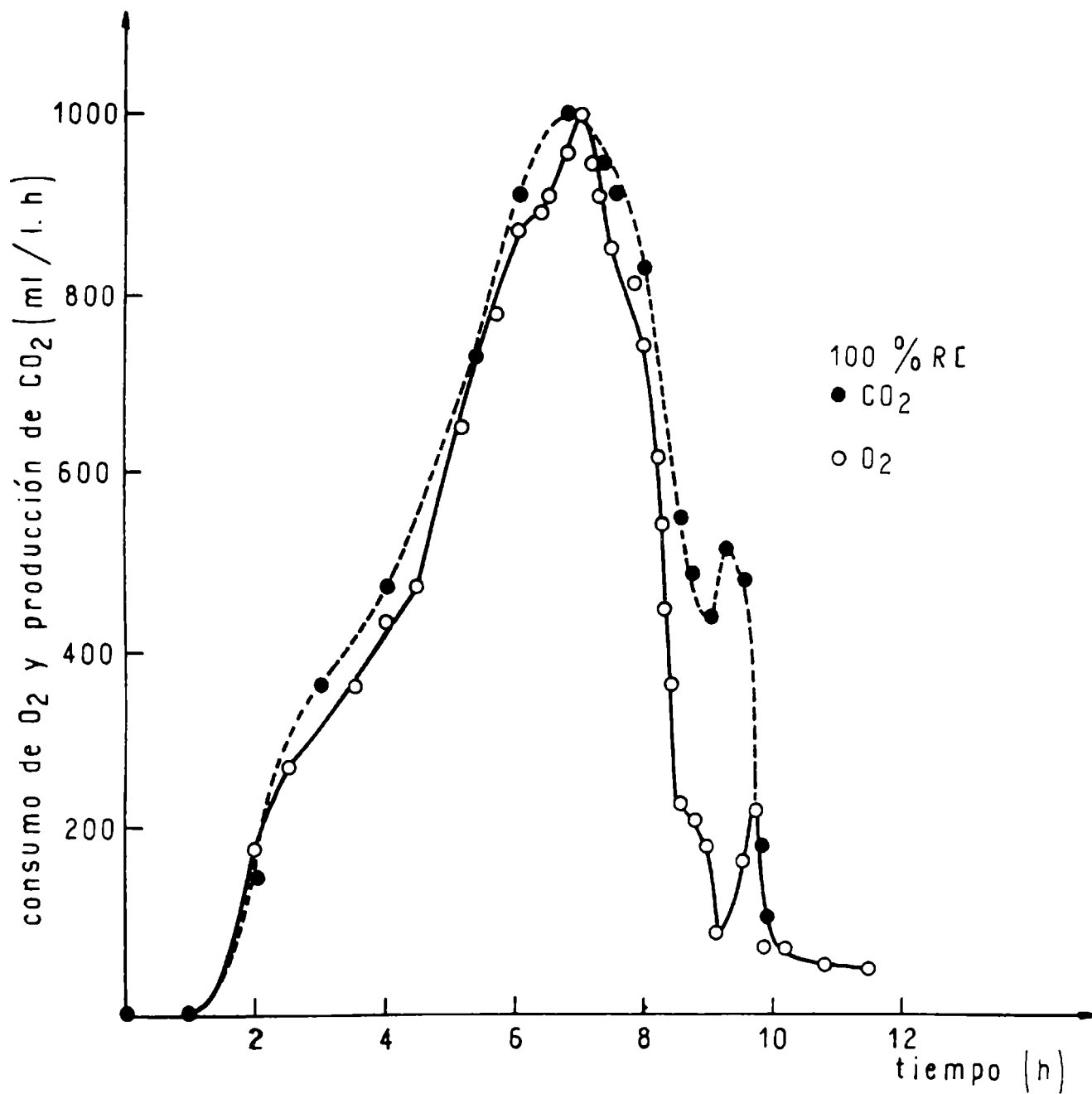


Figura 21: Curvas de consumo de O₂ (○) y producción de CO₂ (●) correspondientes al cultivo en tanque agitado de *K. fragilis*. Composición del inóculo: 100% RC. Medio de cultivo C (g/l): lactosa 15,5; SO₄(NH₄)₂ 2,4; SO₄Mg.7H₂O 0,4; PO₄HK₂ 2,5; ácido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura Oxoid 2,0; pH = 5,5-5,7. Agitación 800 RPM, caudal de aire 60 l/h, volumen de cultivo 3,0 l.

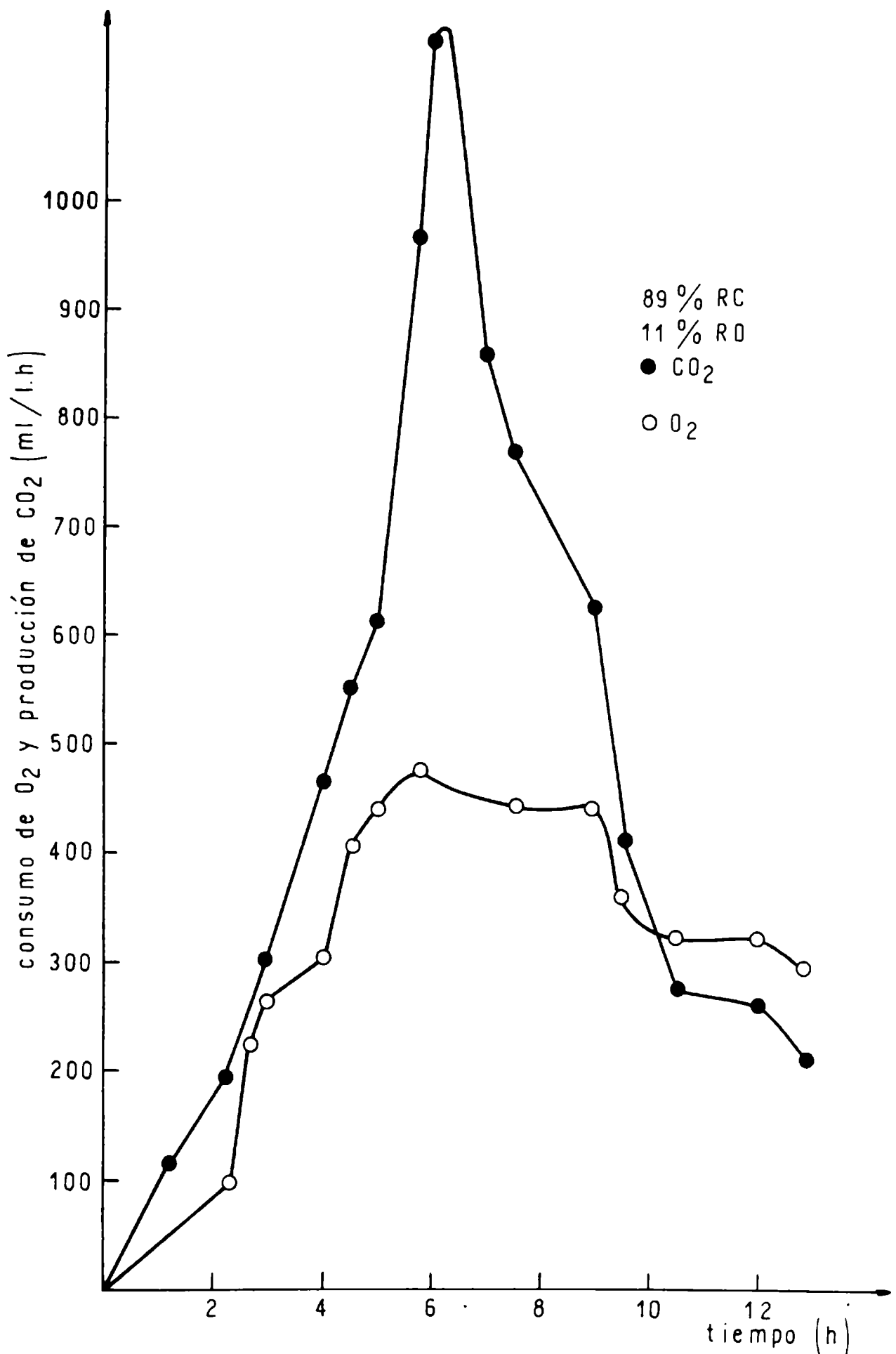


Figura 22: Consumo de O₂ (○) y producción de CO₂ (●) correspondientes a un cultivo en tanque agitado de *K. fragilis*. Inóculo 11% RD; 89% RC. Medio de cultivo C(g/l): Lactosa 15,5; SO₄(NH₄)₂ 2,4; SO₄Mg.7H₂O 0,4; PO₄HK₂ 2,5; Acido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura Oxoid 2,0; pH = 5,5-5,7. Agitación 800 RPM; caudal de aire 60 l/h; volumen de cultivo 3,0 l.

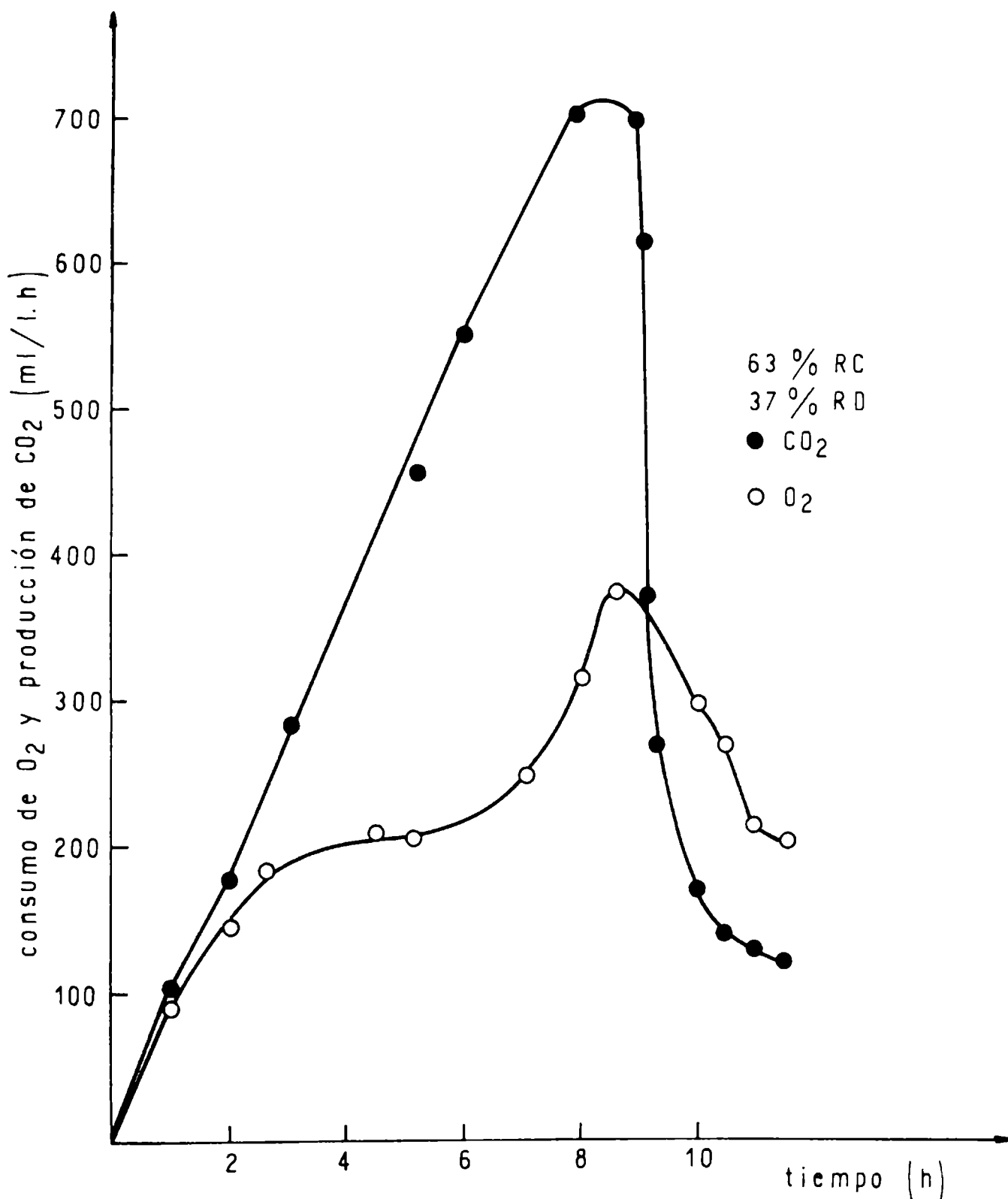


Figura 23: Consumo de O₂ (○) y producción de CO₂ (●) correspondientes a un cultivo en tanque agitado de *K. fragilis*. Inóculo 37% RD; 63% RC. Medio de cultivo C (g/l): Lactosa 15,5; SO₄(NH₄)₂ 2,4; SO₄Mg.7H₂O 0,4; PO₄HK₂ 2,5; Acido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura Oxoid 2,0; pH = 5,5 - 5,7. Agitación 800 RPM; caudal de aire 60 l/h; volumen de cultivo 3,0 l.

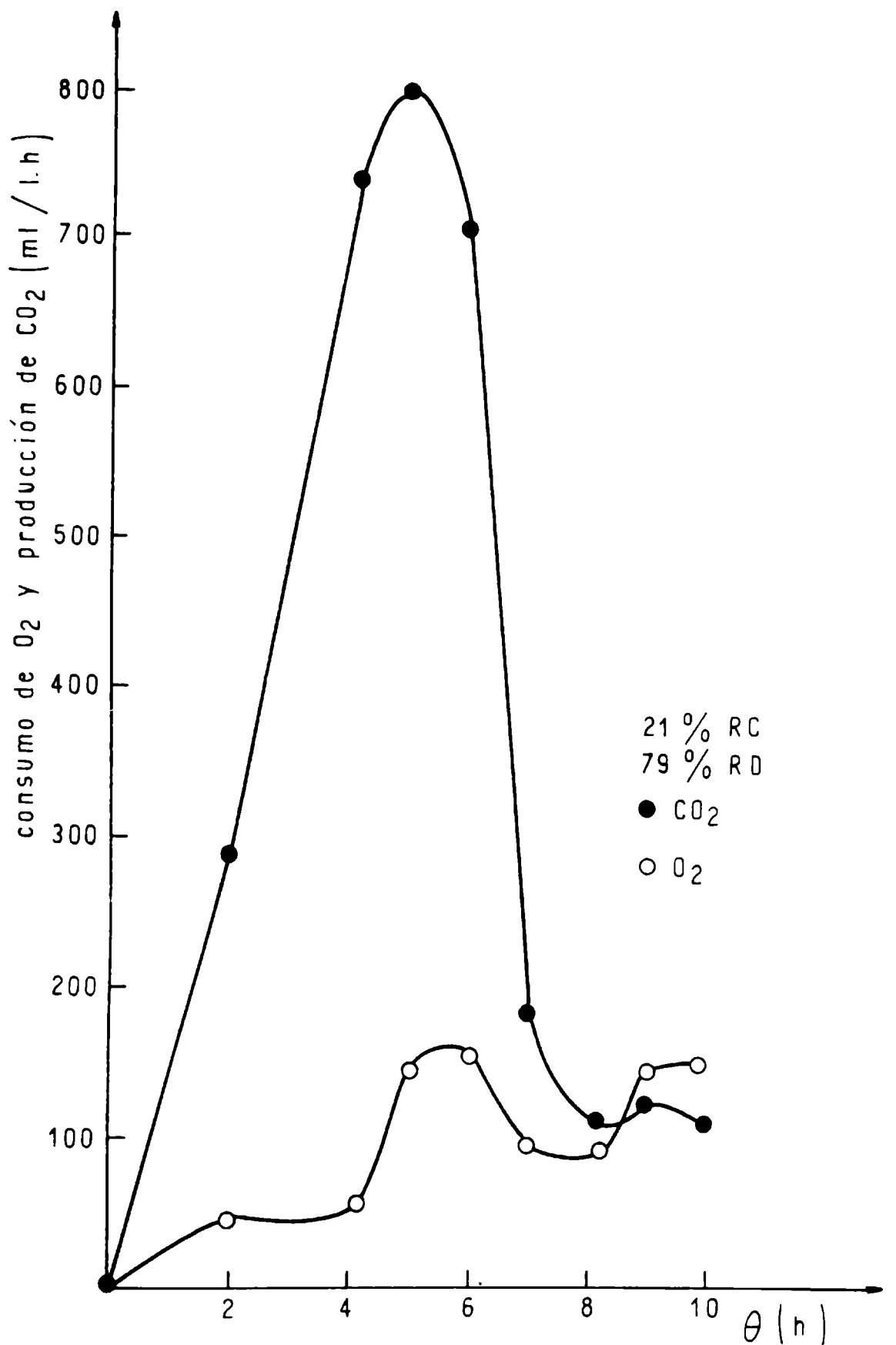


Figura 24: Curvas de consumo de O₂ (○) y producción de CO₂ (●) correspondientes al cultivo en tanque agitado de *K. fragilis*. Composición del inóculo: 21% RC, 79% RD. Medio de cultivo C (g/l): lactosa 15,5; SO₄(NH₄)₂ 2,4; SO₄Mg. 7H₂O 0,4; PO₄HK₂ 2,5; ácido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura Oxoid 2,0; pH = 5,5-5,7. Agitación 800 RPM, caudal de aire 60 l/h, volumen de cultivo 3,0 l.

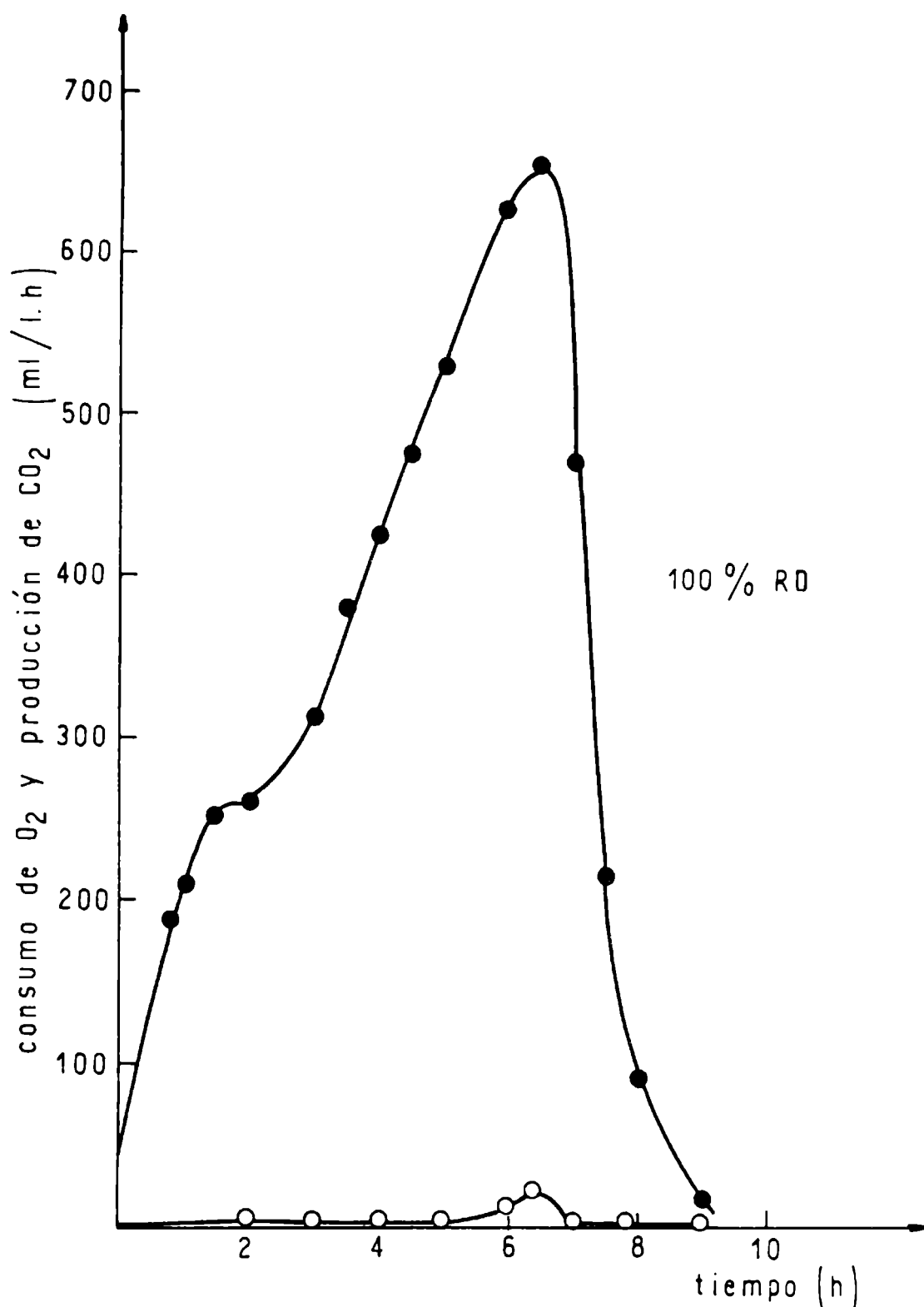


Figura 25: Consumo de O₂ (○) y producción de CO₂ (●) correspondientes a un cultivo en tanque agitado de *K. fragilis*. Inóculo 100% RD. Medio de cultivo C (g/l): Lactosa 15,5; SO₄(NH₄)₂ 2,4; SO₄Mg.7H₂O 0,4; PO₄HK₂ 2,5; Acido cítrico monohidratado 1,09; Extracto de levadura Oxoid 2,0; pH = 5,5-5,7. Agitación 800 RPM; caudal de aire 60 l/h; volumen de cultivo 3,0 l.

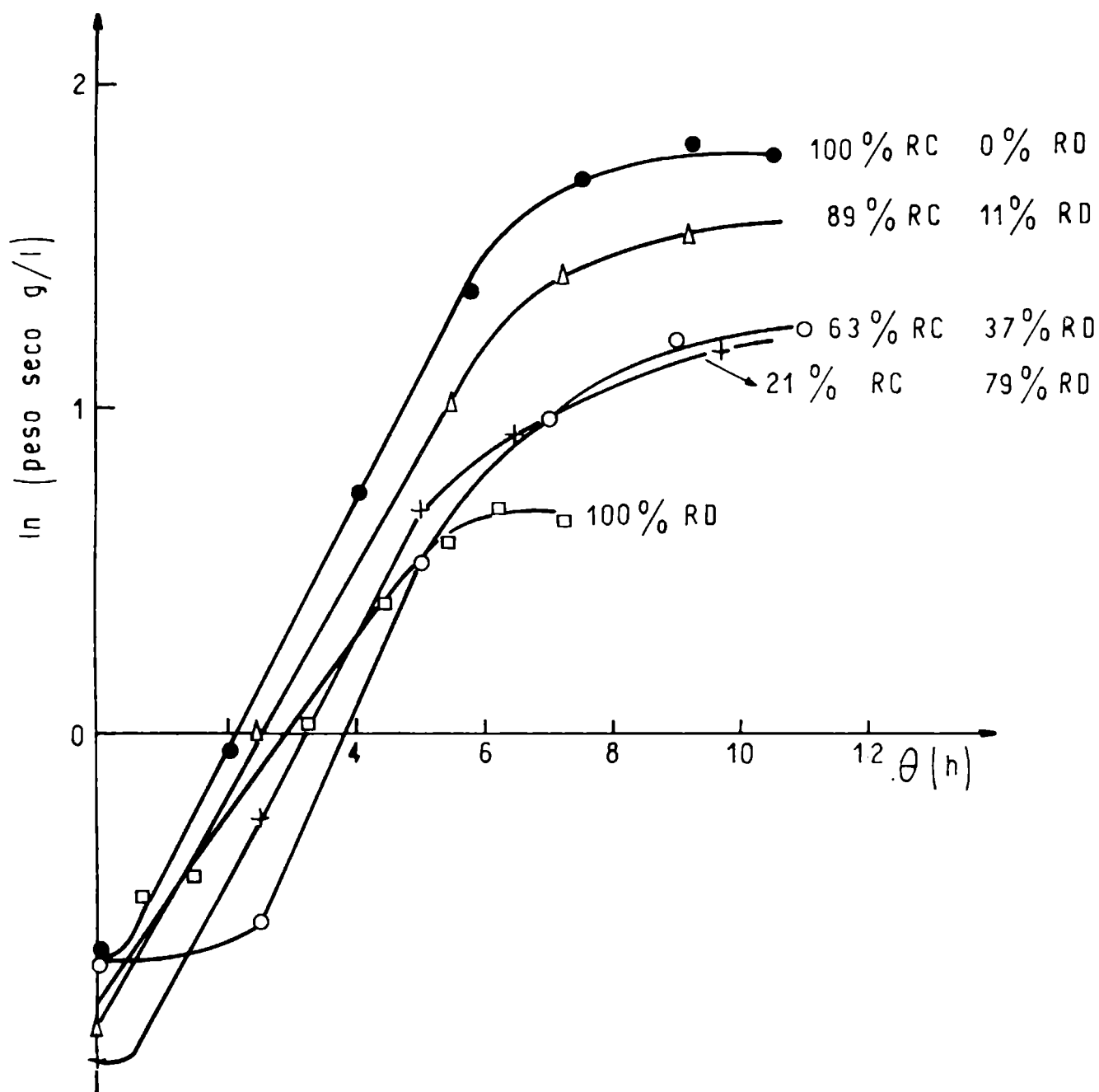


Figura 26. Curvas de crecimiento de procesos con diferentes concentraciones iniciales de células normales (RC) y mutantes deficientes respiratorias (RD).

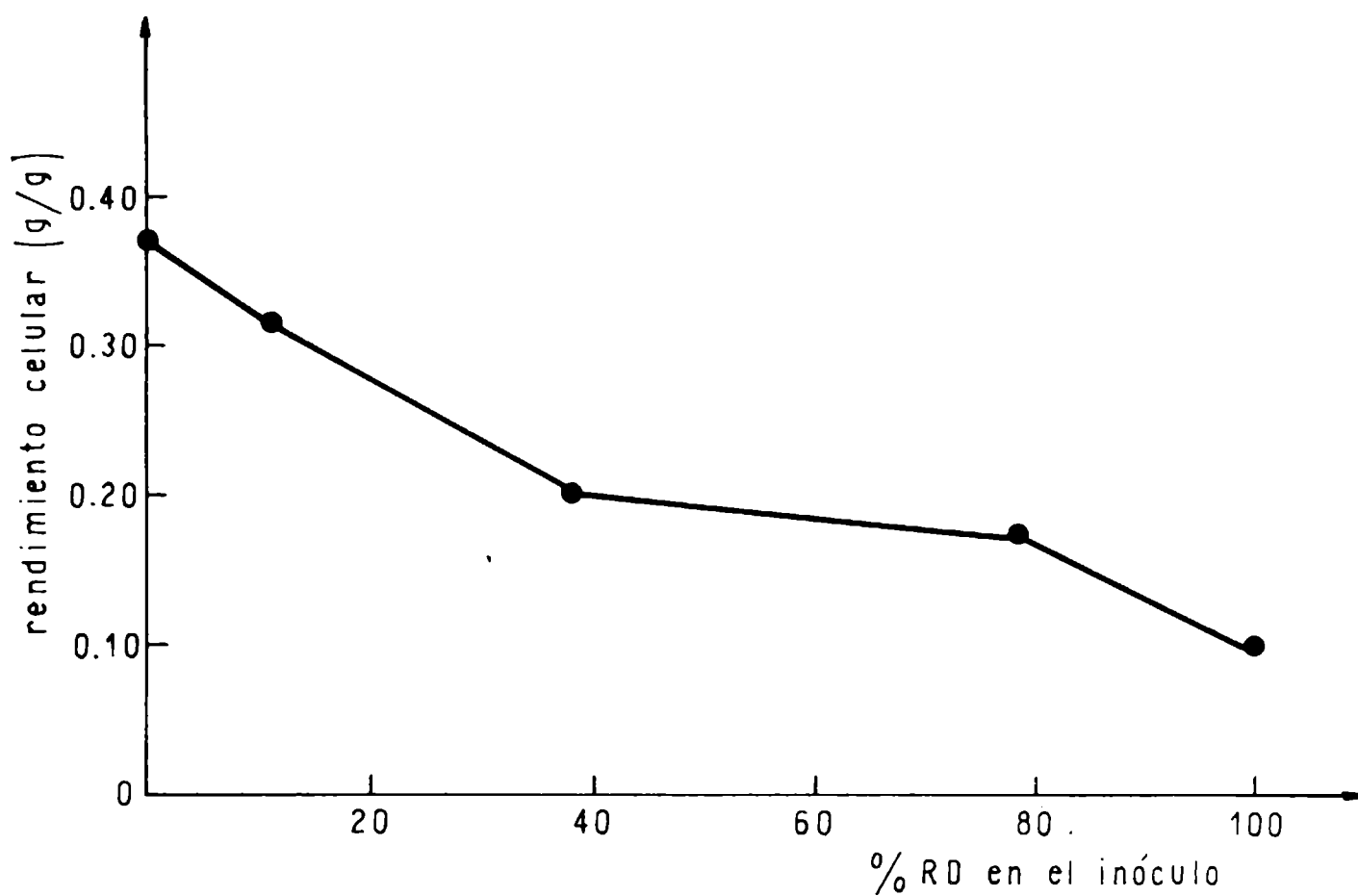


Figura 27: Rendimiento en biomasa en función del porcentaje de células deficientes respiratorias en el inóculo.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de los estudios de balance de medio y condiciones operativas permiten las siguientes consideraciones:

En medios sintéticos conteniendo lactosa como fuente de carbono, sales de $Mg PO_4$, los rendimientos celulares no resultan afectados por el uso de urea o sulfato de amonio y macerado de maíz o extracto de levadura como fuente nitrogenada o aportes de factores de crecimiento. La máxima concentración de lactosa de los medios, para asegurar cultivos aeróbicos con máximos rendimientos celulares es función del Kla del sistema. Los fermentadores agitados disponibles, operando en condiciones de máxima transferencia aseguran que medios sintéticos conteniendo 12 g/l de lactosa den lugar a cultivos no limitados en oxígeno.

La suplementación de suero de queso con sales, fuentes nitrogenadas y factores de crecimiento aumentan sensiblemente los rendimientos celulares en relación al suero de queso sin ningún agregado. Para los tanques de fermentación disponibles, operando en condiciones de máxima transferencia de oxígeno, se hace necesario diluir el suero de queso a valores de lactosa comprendidos entre 12 y 15 g/l a fin de lograr cultivos no limitados en oxígeno.

Con respecto a la producción, análisis y ensayos de alimentación del preparado proteico es interesante destacar que: A las 11 horas de cultivo, se alcanza la máxima concentración celular y la lactosa ha sido totalmente consumida. Este tiempo de retención corto es importante si se considera los grandes volúmenes diarios de suero que producen las fábricas de queso. El tratamiento previo del suero con H_2O_2 resulta efectivo ya que el tenor de lactosa inicial no se modifica en cuatro días (fig. 5)

Los estudios de alimentación de pollos parrilleros empleando balanceados isoproteicos con distintas fuentes de proteínas como harina de carne (HC), harina de pescado (HP) y el preparado proteico obtenido por fermentación (PPF) demuestran el mejor comportamiento del PPF en relación a dietas que contienen HP, HC, y HP + HC.

Del análisis de los resultados de las experiencias realizadas

con pollas ponedoras surge que no existen diferencias significativas en la postura, peso de huevo y conversión. Por lo tanto el preparado proteico en estudio (PPF) puede reemplazar a cualquiera de las harinas animales y vegetales ensayadas que normalmente forman parte de los alimentos balanceados.

En lo que se refiere a los estudios sobre el rendimiento celular en medios que contienen sólidos en suspensión se demuestra que la determinación del rendimiento celular es factible si se conocen los valores inicial y final de extracto seco como así también el consumo de la fuente de carbono y energía. La relación que permite el cálculo del rendimiento está dada por:

$$Y = 1 - \frac{\Delta E}{\Delta S}$$

El método no es aplicable cuando hay formación de producto no volátil y cuando la fuente de nitrógeno puede ser utilizada como fuente de energía. Además el método podría ser útil para detectar estos fenómenos si el medio de cultivo no contiene sólidos en suspensión.

Considerando el cultivo discontinuo alimentado, el modelo sugerido permite predecir el comportamiento de dicho sistema en base a los parámetros del sistema batch (u_o ; S_o ; Y , etc.). Las ecuaciones de diseño propuestas son:

$$k = \frac{u_o X_o}{Y} - \frac{F S_o}{V_o}$$

$$S_{D_o} = S_o + \frac{V_o K}{F}$$

$$S_c = S_{D_o} + \frac{4 K V_o D}{F}$$

Se demuestra la validez de estas ecuaciones con valores determinados experimentalmente.

Por último los estudios sobre la influencia de mutantes respiratorias en el rendimiento de biomasa permiten demostrar la necesidad de controlar, en el inóculo, la homogeneidad de la población ya que la masa celular disminuye proporcionalmente con el aumento de mutantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Nicol, B. Recent developments in the status of international food and nutrition. En: Single Cell Protein, Pág. 7-24. Proceedings of the International Symposium held in Rome, Italy, on November 7-9, 1973. Ed. P. Davis. Ac. Press, 1974.
2. Milner, M. An introduction to the protein problem. Economic Botany, 22, 3-7, 1968.
3. Riviere, J. Industrial Applications of Microbiology. Pág. 106. Ed. Moss, M.O.; Smith, J.E.. John Wiley & Sons. Inc. 1977.
4. Simon, P.; Meunier, R. Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique. Pág. 387. Ed. Masson et Cie. 1970.
5. Szechenyi, E.; Simer, F.; Karpati, G. Production de Levures sur Matieres Grasses d'Origine Animale et Végétale pour l'Alimentation Humaine. Ind. Aliment. et Agric. 93(4), 415-421, 1976.
6. Reed, G.; Peppler, H.J. Yeast Technology. Pág. 7. The Avi Publishing Company, Inc. 1973.
7. Reed, G.; Peppler, H.J. Yeast Technology. Pág. 343. The Avi Publishing Company, Inc. 1973.
8. Mateles, R.I.; Tannenbaum, S.R. Single Cell Protein. Economic Botany. 22(1), 43-50, 1968.
9. Miller, D.S.; Bender, A.E. The Determination of the Net Utilization of Proteins by a Shortened Method. British J. of Nutrition. 9, 382-388, 1955.
10. Colomer-Rocher, F.; Fevrier, C.; Lecourtier, M. Feeding Value of Sulfite Yeast and Yeast Treated Whey for the Rat; Effect of Lysine and Metionine Supplementation. Ann. Zootech. 20, 91-105, 1971.
11. Danielsen, S.; Flanery, R. Processing of SCP for Human Food. En: Single Cell Protein. Proceedings of the International Symposium Held in Rome, Italy, on November 7-9, 1973. Ed.: P. Davis. Ac. Press, 1974.

12. Tannenbaum, S.R.; Miller, S.A. Effect of Cell Fragmentation on Nutritive Value of *Bacillus Megaterium* Protein. *Nature* 214 1261-1262, 1967.
13. Edozien, J.C.; Udo, U.V.; Young, V.R.; Scrimshaw, N.S. Effects of High Levels of Yeast Feeding on Uric Acid Metabolism of Young Men. *Nature*. 228, Pág. 180, 1970.
14. Maul, S.B.; Sinskey, A.J.; Tanenbaum, S.R. New Process for Reducing the Nucleic Acid Content of Yeast. *Nature*, 228, Pág. 181, 1970.
15. Pong Vananuvat; Kinsella, J.E. Extraction of Protein Low in Nucleic Acid, from *Saccharomyces fragilis* Grown Continuously on Crude Lactose. *Agric. and Food Chemistry*. 23, 216-221, 1975.
16. Santos Olivera, J. La Reduction de la Teneur en Acids Nucleiques de la Levure "*Candida utilis*". *Ind. Aliment. et Agric.* 93, 689-693, 1976.
17. Amundson, C.H. Increasing the Protein Content of the Whey through Fermentation. *Procc. Ann. Wash. State Univ. Inst. Dairing*. 33, 23-30, 1966.
18. Wasserman, A.E.; Hopkins, W.J.; Porges, N. Rapid Conversion of Whey to Yeast. *Proc. of XV International Dairy Congress*. 2, 1241-1247, 1959.
19. Wasserman, A.E.; Hopkins, W.J.; Porges, N. Whey Utilization Growth Conditions for *Saccharomyces fragilis*. *Sewage and Industrial Wastes*. 30, 913-920, 1958.
20. Wasserman, A.E. Whey Utilization II. Oxygen Requirements of *Saccharomyces fragilis* in Whey Medium. *Appl. Microbiol.* 8, 291-293, 1960.
21. Van Uden, N. Kinetics and Energetics of Yeast Growth. En: *The Yeasts*. Vol. II, Pág. 75-118. Ed.: Rose, A.H.; Harrison, J.S. Academic Press. 1971.
22. Wasserman, A.E.; Hampon, J.W. Whey Utilization III. Oxygen Absorption Rates and the Growth of *Saccharomyces fragilis* in Several Propagators. *Appl. Microbiol.* 8, 293-297, 1960.

23. Wasserman, A.E. Whey Utilization IV. Availability of Whey Nitrogen for the Growth of *Saccharomyces fragilis*. J. Dairy Sci. 43, 1231-1234, 1960.
24. Sheldon Bernstein; Chu H. Tzeng; Douglas Sisson. The Comercial Fermentation of Cheese Whey for the Production of Protein and/or Alcohol. Biotech. Bioeng. Symposium 7, 1-9, 1977.
25. Mignone, C.F.; Mazza, L.A.; Balatti, A.P. Transformación de Suero de Queso por Procesos Fermentativos. Rev.Fac. de Agron. (3ra. ép.), LV (1-2). La Plata, 49-57, 1979.
26. Reed, G.; Peppler, N.J. Yeast Technology. Pág. 8. The Avi Publishing Company. Inc., 1973.
27. De la Fuente, G.; Sols, A. Transport of Sugars in Yeast. II. Mechanisms of Utilization of Disacarides and Related Glycosides. Biochim. Biophys. Acta 55, 49-62, 1962.
28. Reuvers, T.; Tacorante, E.; García Mendoza, C.; Novaes-Ledieu, M. Chemical Composition of Cell Walls of *Saccharomyces fragilis*. Can. J. Microbiol. 15, 989-993, 1969.
29. Peppler, H.J. Food Yeast. En: The Yeasts. Vol. III, Pág. 421-462. Ed. Rose, A.H.; Harrison, J.S. Academic Press, 1970.
30. Castillo, F.J.; De Sánchez, S.B. Studies on the Growth of *Kluiveromyces fragilis* in Whey for the Production of Yeast Protein. Acta Cient. Venez. 29, 113-118, 1978.
31. Moresi, M.; Nacca, C.; Nardi, R.; Palleschi, C. Factor Analysis in a Whey Fermentation by *Kluiveromyces fragilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 49-61, 1979.
32. Moresi, M.; Colicchio, A.; Sansovini, F. Optimization of Whey Fermentation in Jar Fermenter. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 173-183, 1980.
33. Aiba, S.; Nagai, S.; Nishizawa, Y. Fed Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae*: A Perspective of Computer Control to Enhance the Productivity in Baker's Yeast Cultivation. Biotech.Bioeng. 28, 1001-1016, 1976.
34. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. Eleven Edition 16, 1970. Ed.: Horwitz, H. Pub. A.O.A.C., Washington.

35. Methods in Microbiology. Vol. 5B, 244-249. Ed. by Norris, J.R.; Ribbons, A.W. Ac. Press. 1971.
36. Itzhaki, R.F.; Gill, D.M. A Micro-Biuret Method for Estimating Proteins. Analytical Biochemistry. 9, 401-410, 1964.
37. Ewell, R. Engineering of Unconventional Protein Production. Chem. Eng. Progress Symp. Series. 65, 1-4, 1969.
38. Milner, M. Engineering of Unconventional Protein Production. Chem Eng. Progress. Symp. Series. 65, 5-7, 1969.
39. Humphrey, A.E. Engineering of Unconventional Protein Production. Chem. Eng. Progress Symp. Series. 65, 60-65, 1969.
40. Abbot, J.C. Economics of Single Cell Protein in Relation to World Protein Supplies. En: Single Cell Protein, Pág. 25-45. Proc. of the International Symposium Held in Rome, Italy, on November 7-9, 1973. Ed.: P. Davis. Ac. Press, 1974.
41. Pirt, J.S. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Pág. 211-213. Blackwell Scientific Publications. 1975.
42. Musfeldt, R. Posibilidades Nutricionales de Mejorar la Eficiencia Económica de Ponedoras. Actualidad Avícola, año 1, N°2, 1980.
43. Minkevich, I.G.; Eroshin, V.K. Theoretical Calculation of Mass Balance during the Cultivation of Microorganisms. Biotech. Bioeng. Symp. 4, 21-25, 1973.
44. Nagai, S.; Yanagishima, N.; Nagai, H. Advances in the Study of Respiration-Deficient (RD) Mutation in Yeast and other Microorganisms. Bacteriol. Review, 25, 405-526, 1961.
45. Sherman, F.; Slonimski, P.P. Respiration-Deficient: Mutant of Yeasts. Biochim. Biophys. Acta. 90, 1-15, 1964.
46. Bacila, M.; Xavier, A.W., Horii, J. Induction of Respiration-Deficient Mutants of Saccharomyces and Evaluation of their Efficiency for Ethanol Production. En: Biochemistry and Genetics of Yeasts. Pure and Applied Aspects. Pág. 517-549. Ed.: Bacila, M.; Horecker, L.B.; Stoppani, A.O. Academic Press, 1978.
47. Mortimer, R.K.; Hawthorne, C.D. Yeast Genetics. En: The Yeasts, Vol. 1, Pág. 385-460. Ed. Rose, A.H.; Harrison, J.S. Academic Press, 1969.

48. Ephrussi, B.; Hottinguer, H.; Chimenes, A.M. Action de l'Acriflavine sur les Levures. I. La Mutation "Petite Colonie". *Annáles de l'Intitut Pasteur*. 76, 351-367. 1949.
49. Avers, C.J.; Pfeffer, C.R.; Rancourt, M.W. Acriflavine Induction of Diferent Kinds of "Petite" Mitochondrial Populations in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriol.* 90, 481-494, 1965.
50. Ogur, M.; Lindegren, G.; Lindegren, C.C. A Simple Screening Test for Genetic Studies of Respiration Deficiency in Yeast. *J. of Bacteriol.* 68, 391-392, 1954.
51. Ogur, M.; Ralph, St John. A Differencial and Diagnostic Plating Method for Population Studies of Respiration Deficiency in Yeast. *J. of Bacteriol.* 72, 500-504, 1956.
52. Ogur, M.; Ralph St. John; Nagai, S. Tetrazolium Overlay Technique for Population Studies of Respiration Deficiency in Yeast. *Science*, 125, 928-929, 1957.
53. Nagai, S. Differencial Yeast and Respiration-Deficient Mutants. *J. of Bacteriol.* 90, 220-222, 1965.
54. Nagai, S. Diagnostic Colour Differentiation Plates for Hereditary Respiration Deficiency in Yeast. *J. of Bacteriol.* 86, 299-302, 1963.
55. Jones, R.P.; Pamment, N.; Greenfield, P.F. Alcohol Fermentation by Yeasts. The Effect of Environmental and other Variables. *Process Biochemistry*, 16, 42-49, 1981.
56. Burrows, S. Baker's Yeast. En: *The Yeasts*. Vol. III, Pág. 349-420. Ed.: Rose, A.H.; Harrison, J.S. Academic Press, 1970.
57. Edwards, V.H. The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics. *Biotech. Bioeng.* 12, 679-712, 1970.
58. Hyvarinen, A.; Nikkila, E. Specific Determination of Blood Glucose with O-Toluidine. *Clin. Chim. Acta*, 7, 140-143, 1962.
59. Specific Enzymatic Method for the Determination of Urea in Blood and Urine. *Boletín Informativo "Uremia"*, Marzo 1964. Wiener Lab..
60. Vary, P.S.; Johnson, M.J. Cell Yields of Bacteria grown on Metane. *Appl. Microbiol.* 15, 1473-1478, 1967.

61. Holaser, A.; Flaschka, H. Métodos Quelatométricos y otros Métodos Volumétricos de Análisis Clínico. Ed. Reverte, 1964.
62. Herbert, D.; Phipps, J.; Strange, R.E. Chemical Analysis of Microbial Cells. En: Methods in Microbiology, Vol. 5B, Cap. III. Ed. Norris, J.R.; Ribbons, D.W. Academic Press.
63. Kolthoff, J.M.; Sandeel, E.B.; Meehan, E.J.; Bruckenstein, S. Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Nicar S.R.L. 1972.
64. Raghavendar Rao, S.; Carter, F.L.; Frampton, V.L. Determination of Available Lysine in Oil Seed Meal Proteins. Anal.Chem. 35, 1927-1930, 1963.
65. Travekyan, W.E.; Harrison, J.S. Studies on Yeast. Biochem. Journal 63, 23-33, 1956.
66. Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; Stanffer, J.F. Manometric and Biochemical Techniques. Ed. Burgess Publishing Company, 1972.
67. Cooney, C.L.; Wang, H.Y.; Daniel, I.C. Computer-Aided Material Balancing for Prediction of Fermentation Parameters, Biotech.Bioeng. 19, 55-67, 1977.
68. Kohn-Abrest, E. Précis de Toxicologie. Ed.: G. Doin y Cie. Paris 1955.
69. Harger, R.N. Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods (Vol. II). Ed. Stewart, C.P.; Stolman, A. Ac. Press, 1961.
70. Nagai, S. Induction of the Respiration - Deficient Mutation in Yeast by Various Synthetic Dyes. Science, 130, 1188-1189, 1959.
71. Monod, J. La Technique de la Culture Continue. Théorie et Applications. Ann. Inst. Pasteur 79, 390-410, 1950.
72. Fumitake, Yoshida; Tsuneo Yamane; Ken-Ichiro, Nikamoto. Fed-Batch Hydrocarbon Fermentation with Colloidal Emulsion Feed. Biotech. Bioeng. 15, 257-270, 1973.
73. Pirt, S.J. The Theory of Fed-Batch Culture with Reference to the Penicillin Fermentation. J. Appl. Chem. Biotechnol. 24, 415-424, 1974.

74. Edwards, V.H.; Gottschalk, M.J.; Noojin, A.Y.; Tothill, L.B.; Tannahill, A.L. Extended Culture: The Growth of *Candida Utilis* at Controlled Acetate Concentrations. *Biotech. Bioeng.* 12, 975-999, 1970.
75. Watteeuw, C.M.; Armiger, W.B.; Ristroph, D.L.; Humphrey, A.E. Production of Single Cell Protein from Ethanol by Fed-Batch Process. *Biotech. Bioeng.* 21, 1221 - 1237, 1979.
76. Weigand, W.A. Maximum Cell Productivity by Repeated Fed-Batch Culture for Constant Yield Case. *Biotech. Bioeng.* 23, 249-266, 1981.
77. Srinivasan, V.R.; Fleenor, M.B.; Summers, R.J. Gradient-Feed Method of Growing High Cell Density Cultures of *Cellulomonas* in a Bench-Scale Fermentor. *Biotech. Bioeng.* 19, 153-155, 1977.
78. Jasewicz, L.; Porges, N. Whey Preservation by H_2O_2 . *J. Dairy Sci.* 42, 1119-1125, 1959.
79. Delaney, R.A.M.; Kennedy, R.; Walley, B.D. Composition of *Saccharomyces fragilis* Biomass Grown on Lactose Permeate. *J. Sci. Food. Agric.* 26, 1177-1186, 1975.
80. Cooper, C.M.; Fernston, G.; Milles, S.A. Gas Liquid Contactor. *Indust. Eng. Chem.* 36, 504-509, 1944.
81. Gillies, M.T. Whey Processing and Utilization. Economic and Technical Aspects. Pág. 33. Ed.: Noyes Data Corporation 1974.
82. Boiardi, J.L. Composición y Propiedades de Medios de Cultivo en la Obtención de Caldos de Alta Concentración Celular. Reunión Nacional de Fijación Biológica de Nitrógeno. Noviembre 1981, La Plata, Argentina.